

# **Lokalisierung, Orientierung und Funktion von Connexin 43 in Kardiomyozyten-Mitochondrien**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie und Geografie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Sabine Stahlhofen

aus Düsseldorf

April 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pathophysiologie der Universität Duisburg-Essen oder an einer anderen gleichwertigen Einrichtung durchgeführt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. E. Winterhager
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. R. Schulz
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Meyer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Frau Prof. Dr. S. Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2010

---

Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm.

*Sir Winston Churchill*

## **DANKSAGUNG**

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Schulz vom Institut für Pathophysiologie der Universität Duisburg-Essen für die Vergabe dieses interessanten Themas und seine intensive Ko-Betreuung bedanken. Er konnte mich für die Mitochondrien begeistern und die Arbeit mit seinen Ideen bereichern.

Frau Prof. Dr. E. Winterhager vom Institut für Molekularbiologie der Universität Duisburg-Essen gilt mein besonderer Dank. Sie hat mich durch die hervorragende Kooperation motiviert und so das Fortschreiten dieser Arbeit ermöglicht.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. G. Heusch möchte ich mich für die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsbedingungen und die Diskussionsbereitschaft am Institut für Pathophysiologie der Universität Duisburg-Essen bedanken.

Frau PD Dr. K. Böngler danke ich herzlich für die intensive inhaltliche und auch methodische Beratung sowie die gute persönliche Betreuung.

Allen an meinen Experimenten beteiligten Personen möchte ich ebenfalls danken:

- Die Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. D. Garcia-Dorado ermöglichte neben einem direkten Methodenaustausch auch einige Untersuchungen zur Mitochondrienfunktion an verschiedenen Mausmodellen, die uns ansonsten nicht zur Verfügung gestanden hätten (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spanien).
- Den technischen Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathophysiologie, vor allem Frau A. Büchert, Frau E. Ungefug und Frau A. van de Sand danke ich für methodische Hilfestellungen.
- Den Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. Dr. H. de Groot) danke ich für die Beratung bei auftretenden experimentellen Problemen.

Allen anderen Mitarbeitern, vor allem aber Frau Dr. P. Kleinbongard, J. Musiolik und M. Kirca möchte ich herzlich für die Motivation und die schöne Zeit danken.

Sebastian danke ich von ganzem Herzen für seinen liebevollen und geduldigen Beistand über diese lange Zeit.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bedanken und dafür, dass sie mich immer bei Laune gehalten haben.

**INHALTSVERZEICHNIS**

|  |     |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis                                       | I   |
| Abkürzungsverzeichnis                                    | III |
| 1. Einleitung  | 1   |
| 1.1 Connexine  | 1   |
| 1.1.1 Grundlagen   | 1   |
| 1.1.2 Connexine im Herzen                                | 2   |
| 1.2 Herzinfarkt und Kardioprotektion                     | 3   |
| 1.2.1 Myokardischämie und Reperfusion                    | 4   |
| 1.2.2 Kardioprotektion durch Präkonditionierung          | 5   |
| 1.2.3 Mitochondriale Subpopulationen und Myokardischämie | 7   |
| 1.3 Cx43 beim Myokardinfarkt und der Kardioprotektion    | 10  |
| 1.3.1 Cx43 und Präkonditionierung                        | 10  |
| 1.3.2 Cx43 in Mitochondrien                              | 11  |
| 1.4 Ziel der Arbeit                                      | 11  |
| 2. Material und Methoden                                 | 13  |
| 2.1 Material   | 13  |
| 2.1.1 Chemikalien  | 13  |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterial                                 | 14  |
| 2.1.3 Kits   | 14  |
| 2.1.4 Geräte   | 14  |
| 2.1.5 Antikörper und Enzyme                              | 15  |
| 2.1.6 Tiere und Tierhaltung                              | 16  |
| 2.1.7 PCR-Primer   | 17  |
| 2.1.8 Puffer und Lösungen                                | 17  |
| 2.1.8.1 DNA-Isolierung                                   | 17  |
| 2.1.8.2 Isolierung von Zellen und Zellorganellen         | 17  |
| 2.1.8.3 Proteinbiochemische Methoden                     | 18  |
| 2.1.8.4 Untersuchung der Mitochondrienfunktion           | 20  |
| 2.2 Methoden   | 21  |
| 2.2.1 Genotypisierung der Mäuse                          | 21  |
| 2.2.2 Isolierung von Zellen und Zellorganellen           | 23  |
| 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden                       | 25  |
| 2.2.4 Untersuchung der Mitochondrienfunktion             | 29  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.3   | Statistik   | 34 |
| 3.    | Ergebnisse  | 35 |
| 3.1   | Lokalisation von Cx43 in Mitochondrien                            | 35 |
| 3.1.1 | Charakterisierung der SSM und IFM                                 | 35 |
| 3.1.2 | Cx43 und IFM  | 36 |
| 3.2   | Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran von SSM | 37 |
| 3.2.1 | Untersuchung isolierter SSM                                       | 38 |
| 3.2.2 | Generierung und Untersuchung von Mitoplasten                      | 39 |
| 3.2.3 | Immunzytochemische Untersuchung fixierter SSM                     | 42 |
| 3.3   | Bildung von Cx43-Halbkanälen in SSM                               | 43 |
| 3.3.1 | „Cross-Linking“-Experimente                                       | 43 |
| 3.3.2 | Farbstoffaufnahme unter Verwendung von Cx43-Halbkanalblockern     | 44 |
| 3.4   | Funktion von Cx43-Halbkanälen in der inneren Mitochondrienmembran | 45 |
| 3.4.1 | Einfluss von Cx43 auf die mitochondriale Respiration              | 45 |
| 3.4.2 | Rolle von Cx43 auf den mitochondrialen Kaliumgehalt               | 49 |
| 4.    | Diskussion  | 52 |
| 4.1   | Cx43-Lokalisation, Orientierung und Halbkanalbildung              | 53 |
| 4.2   | Funktion von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran             | 56 |
| 4.3   | Ausblick  | 59 |
| 5.    | Zusammenfassung   | 60 |
|       | Literaturverzeichnis  | 62 |
|       | Tabellenverzeichnis   | 68 |
|       | Abbildungsverzeichnis   | 68 |
|       | Anhang  | 70 |
|       | Lebenslauf  | 70 |
|       | Publikationen   | 71 |
|       | Posterpräsentationen  | 72 |
|       | Erklärungen   | 73 |

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                |  |
|----------------|--|
| 4-OHT          | 4-Hydroxytamoxifen   |
| 18 $\alpha$ GA | 18- $\alpha$ -Glcyrretinsäure  |
| Abb.           | Abbildung  |
| abstr.         | Abstract   |
| A. dest.       | destilliertes Wasser ( <i>Aqua destillata</i> )  |
| ADP            | Adenosindiphosphat   |
| AIF            | Apoptose-induzierender Faktor  |
| AKT            | Proteinkinase B  |
| ANOVA          | Varianzanalyse (analysis of variance)  |
| ATP            | Adenosintriphosphat  |
| bp             | Basenpaare (base pairs)  |
| BSA            | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)  |
| bzw.           | beziehungsweise  |
| ca.            | circa  |
| cAMP           | zyklisches Adenosinmonophosphat  |
| CT             | C-terminale Domäne   |
| Cx             | Connexin   |
| CyPD           | Cyclophilin D  |
| cyt c          | Cytochrom c  |
| Da             | Dalton   |
| Diablo         | Direkt IAP-bindendes Protein mit niedrigem pI (direct IAP binding protein with low pI) |
| DMS            | Dimethylsuberimidat  |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid   |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP           | Desoxynukleosidtriphosphat   |
| DTT            | Dithiothreitol   |
| EDTA           | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure  |
| EGTA           | Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure                         |
| ERK1/2         | extrazelluläre Signal-regulierte Kinase  |
| <i>et al.</i>  | und andere („ <i>et alii</i> “)  |
| EtOH           | Ethanol  |

|                      |   |
|----------------------|---|
| FACS                 | Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting) |
| FITC                 | Fluorescein-Isothiocyanat   |
| g                    | Erd(schwere)beschleunigung  |
| GAPDH                | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                                    |
| Gsk-3 $\beta$        | Glykogen Synthase-3 $\beta$   |
| HEPES                | N-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure)                        |
| HRP                  | Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)                              |
| Hsp90                | Hitzeschockprotein 90 (heat shock protein 90)                               |
| IAP                  | Inhibitor der Apoptose Proteine (inhibitor of apoptosis protein)            |
| IFM                  | inter(myo)fibrilläre Mitochondrien  |
| IgG                  | Immunglobulin G   |
| Isch                 | Ischämie  |
| JAK                  | Januskinase (just another kinase)   |
| kDa                  | Kilodalton  |
| Konz.                | Konzentration   |
| MAPK                 | Mitogen-aktivierbare Proteinkinase  |
| max.                 | maximal   |
| MEK1/2               | Mitogen-aktivierte Proteinkinase  |
| mitoK <sub>ATP</sub> | mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal                                  |
| mmHg                 | Millimeter Quecksilbersäule   |
| MnSOD                | Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase (Manganese superoxide dismutase)       |
| MOPS                 | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure  |
| mPTP                 | mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore                               |
| n                    | Stichprobenumfang   |
| NO                   | Stickstoffmonoxid   |
| NT                   | N-terminale Region  |
| p                    | Irrtumswahrscheinlichkeit   |
| p70S6K               | p70 ribosomale S6 Proteinkinase   |
| PBS                  | Phosphat gepufferte Salzlösung  |
| PCR                  | Polymerase-Kettenreaktion   |
| pH                   | pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii                                  |



|                  |  |
|------------------|--|
| pI               | isoelektrischer Punkt (isoelectric point)  |
| PI3K             | Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase   |
| PKA              | Proteinkinase A  |
| PKC              | Proteinkinase C  |
| PKG              | Proteinkinase G  |
| PMSF             | Phenylmethansulfonylfluorid  |
| PP               | Proteinphosphatasen  |
| Rep              | Reperfusion  |
| RNA              | Ribonukleinsäure   |
| RNS              | reaktive Stickstoffspezies   |
| rpm              | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)   |
| ROS              | reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)   |
| SDS              | Natriumdodecylsulfat   |
| SDS-PAGE         | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| SEM              | Standardfehler (standard error of mean)  |
| Smac             | zweiter Mitochondrien-abgeleiteter Caspase-Aktivator<br>(second mitochondria-derived activator of caspase) |
| SR               | sarkoplasmatisches Retikulum   |
| SSM              | subsarkolemmale Mitochondrien  |
| STAT             | Signalübermittler und Aktivator der Transkription (signal<br>transducer and activator of transcription)    |
| Tab.             | Tabelle  |
| TBS              | Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)  |
| TEA <sup>+</sup> | Tetraethylammonium   |
| TM               | Marke, Markenname (Trademark)  |
| TNF $\alpha$     | Tumornekrosefaktor $\alpha$  |
| TOM20            | Translokase durch die äußere Membran 20 (translocase<br>of the outer membrane 20)                          |
| Tris             | Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan   |
| UCP3             | Entkopplungsprotein 3 (uncoupling protein 3)   |
| UV               | Ultraviolettes Licht   |
| VDAC             | Spannungsabhängiger Anionenkanal (Voltage-dependent<br>anion channel)                                      |
| vgl.             | vergleiche   |

|       |   |
|-------|---|
| vs.   | gegen, gegenüber gestellt ( <i>versus</i> ) |
| v-src | virales Sarcom                              |
| w/v   | Gewichtsprozent                             |
| z. B. | zum Beispiel                                |

SI-Einheiten wurden entsprechend abgekürzt und sind hier nicht erläutert, ebenso wie die Abkürzungen der Elemente und Chemikalien.

## **1. EINLEITUNG**

Aus Connexinen aufgebaute Kanäle (Connexone) stellen die Verbindung benachbarter Zellen her und sind im Herzen vor allem für die Reizweiterleitung und somit eine synchrone Kontraktion des Herzmuskels essentiell. Connexone und die Zell-Zell-Kopplung spielen aber auch eine zentrale Rolle bei ischämischen Vorgängen sowie bei der Vermittlung kardioprotektiver Signale: Im Folgenden wird die Bedeutung von Connexonen bzw. Connexin in Ischämie und Reperfusion sowie bei kardioprotektiven Mechanismen beschrieben. Bekannte Funktionen und Aufgaben eines bestimmten Connexins in anderen subzellulären Lokalisationen, die ebenfalls für die Kardioprotektion wichtig sind, werden vorgestellt.

### **1.1 Connexine**

#### **1.1.1 Grundlagen**

Der Mensch exprimiert 21, die Maus 20 verschiedene Connexine, die nach ihrem Molekulargewicht unterschieden und benannt werden. Alle Connexine bestehen aus vier Transmembran-Domänen, die über zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife miteinander verbunden sind, sowie die ins Zytosol gerichteten Amino- und Carboxy-Termini. Connexine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und danach posttranslational modifiziert. Im trans-Golgi-Apparat werden Connexine zu Hexameren (Connexonen) verbunden und anschließend in die Plasmamembran eingebaut [Nicholson, 2003]. Die Halbwertszeit von Connexinen ist kurz; für das kardial exprimierte Connexin 43 (Cx43) beispielsweise beträgt sie etwa 1,5 Stunden, danach wird es proteasomal oder lysosomal abgebaut [Beardslee et al., 1998].

Über die extrazellulären Schleifen sind Connexone benachbarter Zellen miteinander verbunden und bilden so interzelluläre Kanäle, die sich in Plaques zusammenlagern und so eine Gap Junction bilden. Die einzelnen Gap Junction-Kanäle haben eine Länge von etwa 150 Å und einen Durchmesser von 12-13 Å. Abhängig von der Zusammensetzung unterscheidet man zwischen homologen (beide Connexone bestehen aus den gleichen Connexinen) und heteromeren Gap Junctions (beide Connexone bestehen aus verschiedenen Connexinen). Gap Junctions erlauben den direkten Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von 1,5 kDa zwischen den Zytosolen der verbundenen Zellen. Ungekoppelte Connexone, so genannte Halbkanäle, können Signalstoffe aus dem Zytosol in den Extrazellularraum

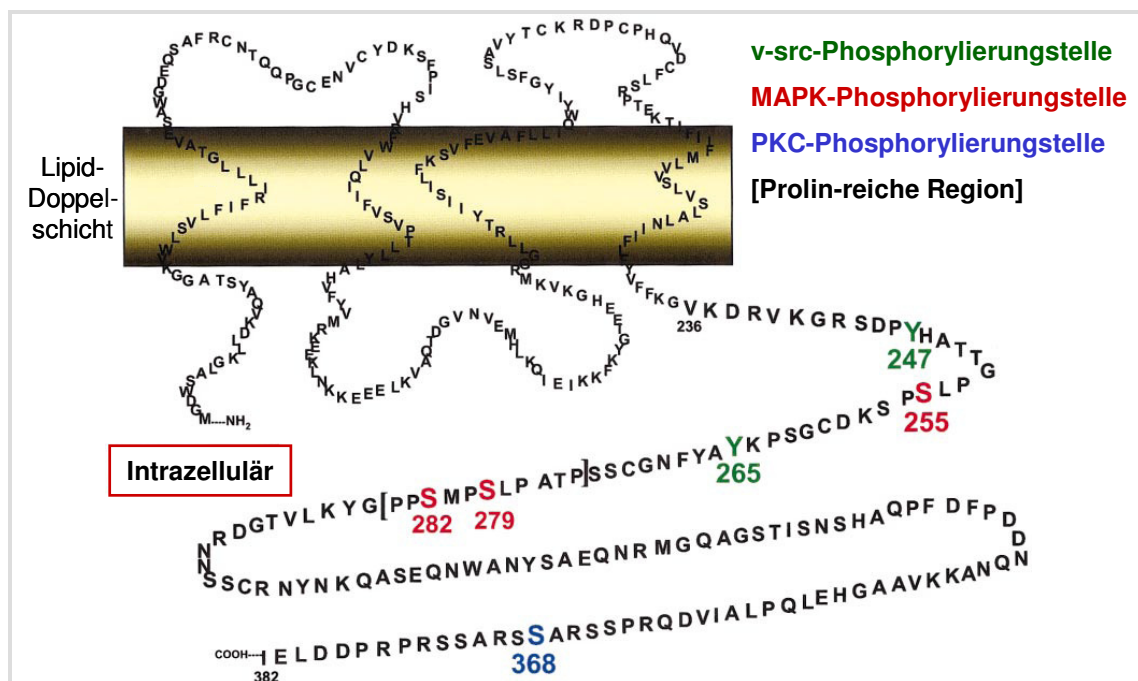
freisetzen. Halbkanäle sind außerdem an der Volumenregulation der Zellen beteiligt [Rodriguez-Sinovas et al., 2007].

Im weiteren Verlauf werden ausschließlich Connexine und deren Funktion im Herzen besprochen.

### 1.1.2 Connexine im Herzen

Im humanen Myokard kommen Cx43, Connexin 45 (Cx45) und Connexin 40 (Cx40) in unterschiedlicher Verteilung vor [Desplantez et al., 2007]. Im Arbeitsmyokard wird fast ausschließlich Cx43, im Vorhof hingegen Cx43 und Cx40 in etwa gleicher Menge exprimiert. Im Sinusknoten ist Cx45 am häufigsten vertreten [van Veen et al., 2001]. Im Arbeitsmyokard sind die Gap Junctions fast ausschließlich an den Glanzstreifen (intercalated discs) lokalisiert und beschleunigen dadurch die Reizleitung in longitudinaler Richtung. Allerdings liegen auch vereinzelt Halbkanäle an der lateralen Plasmamembran (transversale Richtung) vor.

Die Offenwahrscheinlichkeit von Gap Junction-Kanälen wird über Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten reguliert. Gap Junction-Kanäle sind aber auch je nach ihrer Zusammensetzung spannungs-, Kalzium- und pH-Wert-abhängig.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung von Cx43 [modifiziert nach Lampe und Lau, 2000].

Dargestellt sind die einzelnen Phosphorylierungsstellen für die bekanntesten Proteinkinasen, die Cx43 bzw. Gap Junction-Kanäle regulieren.

Die Phosphorylierungsstellen aller Connexine liegen überwiegend in deren Carboxy-Termini (Abb. 1.1). Das im Arbeitsmyokard vorherrschende Cx43 wird im Western Blot mit drei verschiedenen Molekulargewichten detektiert, die unterschiedliche Phosphorylierungszustände des Proteins anzeigen und mit verschiedenen Leitfähigkeiten der Gap Junction-Kanäle einhergehen [van Veen et al., 2001]. Cx43 enthält Phosphorylierungsstellen für PKC (Proteinkinase C), PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase A), PKG (cGMP-abhängige Proteinkinase G) und MAPK (Mitogen-aktivierbare Proteinkinase; mitogen-activated protein kinase). Die PKC-Isoformen, die Cx43 in Kardiomyozyten phosphorylieren, sind spezies-abhängig; beim Menschen sind vor allem für PKC $\alpha$  und PKC $\epsilon$  Protein-Protein-Interaktionen mit Cx43 nachgewiesen [Bowling et al., 2001], bei Mäusen und Ratten interagiert Cx43 hauptsächlich mit der PKC $\epsilon$  [Doble et al., 2000]. Phosphorylierung des Serin 368 im Carboxy-Terminus von Cx43 durch PKC senkt die Leitfähigkeit von Gap Junction-Kanälen [Ek-Vitorin et al., 2006]. Die Aktivierung von MAPK über EGF (epidermal growth factor; Epidermaler Wachstumsfaktor)- oder PDGF (platelet-derived growth factor; Blutplättchen-freigesetzter Wachstumsfaktor)-Rezeptoren senkt ebenfalls die Leitfähigkeit der Cx43-Gap Junction-Kanäle, ebenso wie die Phosphorylierung von Cx43 durch PKA [van Veen et al., 2001] oder die Protein-Tyrosin-Kinase v-src (virales Sarcom) [Lampe und Lau, 2000]. Auch eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration schließt die Gap Junction-Kanäle über eine Kalzium-induzierte Calmodulin-Bindung vermutlich an den N-Terminus von Cx43 [Lurtz und Louis, 2007]. Durch Aktivierung der Proteinphosphatasen 1A und 2A (PP1A und PP2A) hingegen wird Cx43 dephosphoryliert und die Gap Junction-Kanal-Konformation mit der höchsten Leitfähigkeit begünstigt [Chen et al., 2004; Totzeck et al., 2008]. Neben den Gap Junction-Kanälen kommen auch ungepaarte Halbkanäle vor, deren Offenwahrscheinlichkeit und Leitfähigkeit ebenfalls durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert wird. Die Öffnung der Halbkanäle wird aber auch durch eine niedrige extrazelluläre Kalzium-Konzentration [Quist et al., 2000] oder durch Membrandepolarisation begünstigt [Saez et al., 2005].

## 1.2 Herzinfarkt und Kardioprotektion

Eine Myokardischämie ist das grundlegende pathophysiologische Geschehen der Krankheitsbilder, die unter dem Begriff "Koronare Herzkrankheit" zusammengefasst werden. Die Ischämie ist dabei selten ein globales, das ganze Herz betreffendes Geschehen, sondern meistens auf ein Myokardareal begrenzt. Die Folgen einer

Myokardischämie hängen von der Dauer und dem Schweregrad der Minderdurchblutung ab. Tritt eine Reperfusion des zuvor ischämischen Myokards ein, bevor Gewebe zugrunde geht, so wird sich die Funktion des Myokards binnen Stunden oder Tagen vollständig erholen. Überschreitet jedoch eine schwere Myokardischämie einen Zeitraum von 30 - 40 Minuten (spezies-abhängig und abhängig vom Schweregrad der Durchblutungsverminderung), so beginnt die Ausbildung von Nekrosen, im klinischen Szenario der Herzinfarkt.

### 1.2.1 Myokardischämie und Reperfusion

Während einer akuten Ischämie wird das Myokard mit Substraten und Sauerstoff unterversorgt, infolge dessen ist die ATP-Versorgung über die oxidative Phosphorylierung nicht mehr ausreichend gewährleistet. Durch den Sauerstoffmangel erhöht sich der anaerobe Metabolismus, bei dem aber weniger ATP gewonnen wird. Außerdem steigen freies Phosphat und Laktat an und der pH-Wert sinkt [Opie und Sack, 2002; Schrader, 1985]. Die erhöhte intrazelluläre Protonen ( $H^+$ )-Konzentration beschleunigt den Austausch gegen Natrium ( $Na^+$ ) über den  $Na^+/H^+$ -Austauscher, wodurch der intrazelluläre Natriumspiegel während der Ischämie ansteigt. Auf Grund des ATP-Mangels kann die intrazelluläre Natrium-Konzentration nicht über die  $Na^+/K^+$ -ATPase normalisiert werden [Halestrap et al., 2007]. Damit einher geht eine Erhöhung des intrazellulären Kalzium ( $Ca^{2+}$ )-Gehaltes während der Ischämie, da Natrium vermehrt gegen Kalzium über den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher ersetzt wird und die ATP-abhängige Aufnahme von Kalzium ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) reduziert ist [Ferdinandy et al., 2007]. Ein Teil des intrazellulären Kalziums wird vermehrt von den Mitochondrien aufgenommen. Auch der Gehalt an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) steigt etwa 20-25 Minuten nach Beginn der Ischämie an [Kevin et al., 2003]. Durch die erhöhten zellulären ROS- und Kalzium-Konzentrationen werden degradierende Enzyme (Phospholipasen, Proteasen) aktiviert, die Proteine und Membranen schädigen; diese Schäden können wegen des ATP-Mangels nicht von Reparatur-Systemen behoben werden [Halestrap et al., 2007].

Durch den plötzlichen und starken Anstieg der Sauerstoff-Konzentration bei Beginn der Reperfusion wird der Elektronentransport der Atmungskette in den Mitochondrien reaktiviert. Durch die Veränderungen der oxidativen Phosphorylierung und des Membranpotentials während der Ischämie werden jedoch initial verstärkt ROS sowie reaktive Stickstoffteilchen (reactive nitrogen species, RNS) gebildet [Suleiman et al.,

2001]. Außerdem wird zu Beginn der Reperfusion durch die Bereitstellung von ATP vermehrt intrazelluläres Kalzium vom SR aufgenommen, bis dessen Aufnahmekapazität erreicht ist und Kalzium wieder freigesetzt wird (Kalzium-Oszillationen) [Piper et al., 2008]. Diese Kalzium-Oszillationen aktivieren zum einen Proteasen und Phospholipasen, zum anderen wird aber auch vermehrt Kalzium von den Mitochondrien aufgenommen [Halestrap et al., 2007]. Der erhöhte mitochondriale Kalzium-Gehalt induziert zusammen mit der erhöhten ROS- und RNS-Konzentration die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP, mitochondrial permeability transition pore) [Ferdinandy et al., 2007]. Das Mitochondrium schwillt an und sprengt die äußere Membran ab, wodurch apoptotische und nekrotische Signalwege aktiviert werden [Ferdinandy et al., 2007]. Die erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration in Gegenwart von ATP bewirkt aber auch eine Hyperkontraktion, wodurch das in der Ischämie schon vorgeschädigte Sarkolemma zerreißt [Ruiz-Meana et al., 2009]. Durch Gap Junction-Kanäle werden Natrium- und Kalzium-Ionen an benachbarte Zellen weitergeleitet und können dort die zuvor beschriebenen zellulären Vorgänge ebenfalls initiieren. Das apoptotische und nekrotische Areal wird durch die elektrische und chemische Kopplung benachbarter Zellen über Zell-Zell-Kontakte vergrößert, daher spricht man von der Ausbreitung des Schadens (spreading of injury) [Garcia-Dorado et al., 2004]. Das in der Ischämie minderversorgte Gewebe wird durch die Reperfusion teilweise irreversibel geschädigt. Daher sind kardioprotektive Mechanismen, welche die Ausprägung des Gewebeschadens verringern, von großer Bedeutung und werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

### **1.2.2 Kardioprotektion durch Präkonditionierung**

Kurze Zyklen von Ischämie und Reperfusion vor einer nachfolgenden andauernden Ischämie mit Reperfusion senken die Infarktgröße und verbessern die Herzfunktion in allen bisher untersuchten Spezies. Dieses Phänomen wurde erstmals von Murry *et al.* beschrieben und wird als ischämische Präkonditionierung bezeichnet [Ferdinandy et al., 2007; Murry et al., 1986]. Die ischämische Präkonditionierung ist die effektivste aller bekannten Kardioprotektionen. Präkonditionierung kann außerdem pharmakologisch induziert werden und auch beim Menschen konnte eine vergleichbare Kardioprotektion durch Vorerkrankung an Präinfarkt-Angina nachgewiesen werden [Abete et al., 1997]. Der Schutz durch ischämische Präkonditionierung wird in mehrere Zeitfenster unterteilt; das erste, akute Zeitfenster

beginnt unmittelbar nach den präkonditionierenden Ischämie- und Reperfusionszyklen und hält etwa drei Stunden an (akute ischämische Präkonditionierung) [Ferdinandy et al., 2007]. Ein zweites Fenster der Protektion, die sogenannte verzögerte ischämische Präkonditionierung (delayed ischemic preconditioning) setzt etwa 24 Stunden nach der präkonditionierenden Ischämie ein und hält einige Tage an. Die Infarktgröße wird ebenfalls reduziert und die Herzfunktion verbessert, allerdings ist die Protektion nicht so stark wie bei der akuten ischämischen Präkonditionierung. Beim Schutz durch das zweite Fenster der Präkonditionierung ist eine gesteigerte Transkription und Translation von Proteinen beteiligt [Zaugg et al., 2003]. Ein drittes Fenster der Kardioprotektion existiert nach koronarer Mikroembolisation; die durch Mikroembolisation entstehenden Mikroinfarkte induzieren Zytokine, besonders  $\text{TNF}\alpha$ , welche die Bereiche um die Mikroinfarkte noch mehrere Stunden nach dem Infarkt gegenüber einer weiteren Ischämie/Reperfusion schützen [Skyschally et al., 2008].

Die Signaltransduktionskaskade der akuten ischämischen Präkonditionierung kann unterteilt werden in 1) die Auslöser (Trigger), die während den kurzen präkonditionierenden Ischämie/Reperfusionszyklen den kardioprotektiven Prozess einleiten, 2) die Vermittler (Mediatoren), die in der Präkonditionierungsphase, aber auch während der lang anhaltenden Ischämie die intrazelluläre protektive Signalkaskade weiterleiten und 3) die End-Effektoren, die während der lang anhaltenden Ischämie und Reperfusion schließlich das Ausmaß an Apoptose und Nekrose reduzieren [Skyschally et al., 2008].

Eine besondere Rolle bei der (ischämischen) Präkonditionierung wird den Mitochondrien zuteil, die als Vermittler, aber auch als End-Effektor an der Kardioprotektion beteiligt sind. Einige der Auslöser bewirken die Öffnung der mitochondrialen ATP-abhängigen Kalium-Kanäle ( $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ), wodurch der KaliumEinstrom in die mitochondriale Matrix erhöht und so das mitochondriale Membranpotential verändert wird. Dies reduziert die Einstromgeschwindigkeit für Kalzium; durch die leichte Mitochondrienschwellung wird die Atmungskette teilweise entkoppelt. Dadurch werden verstärkt ROS in der mitochondrialen Atmungskette produziert. Freigesetzte ROS bewirken in einer positiven Rückkopplung die Aktivierung von Proteinkinasen, welche indirekt über die Öffnung der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle weitere ROS-Freisetzungen induzieren. Auch durch pharmakologische

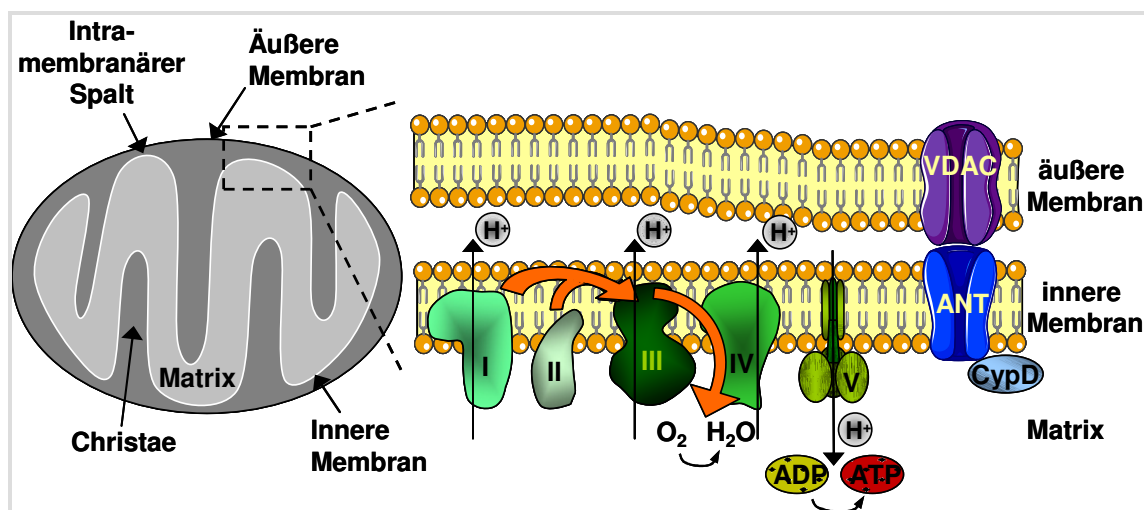


Öffnung der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle, beispielsweise durch Diazoxid, wird die ROS-Produktion gesteigert und dies wirkt kardioprotektiv.

Die Mitochondrien sind aber auch ein End-Effektor der Präkonditionierung. Alle vermittelnden Signalwege enden in der Phosphorylierung und dadurch der Inhibierung der GSK-3 $\beta$  (Glykogen Synthase-3 $\beta$ ), wodurch die Öffnung der mPTP und somit die Auslösung apoptotischer und nekrotischer Kaskaden verzögert wird. Auch der reduzierte Kalziumeinstrom in die Mitochondrien verzögert die mPTP-Öffnung [Heusch und Schulz, 2006].

### 1.2.3 Mitochondriale Subpopulationen und Myokardischämie

Mitochondrien sind Zellorganellen, deren Hauptaufgabe die Energieversorgung der Zelle ist (Abb. 1.2).

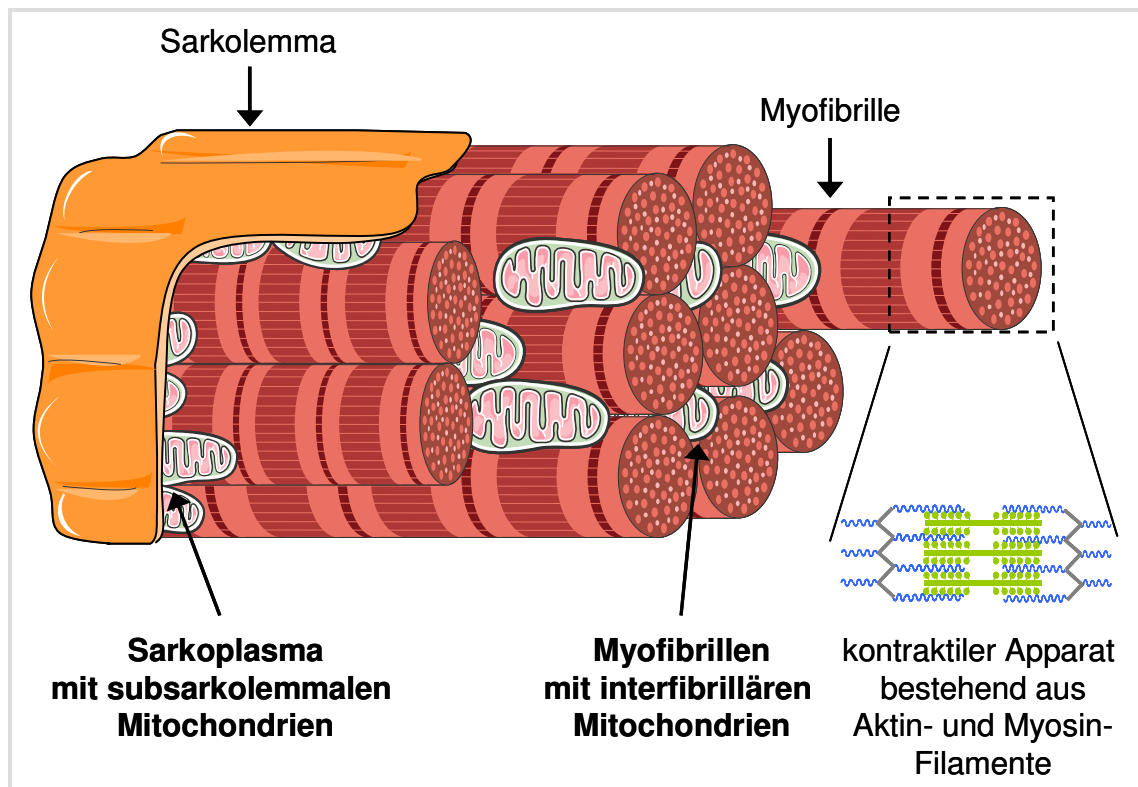


**Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Mitochondriums und der Atmungskette.**

Mitochondrien bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran, wobei die innere Membran als Christae gefaltet die mitochondriale Matrix umschließt. Zwischen der inneren und der äußeren Membran liegt der intermembranäre Spalt. Die Vergrößerung zeigt die Atmungskette, die aus fünf verschiedenen Respirationskomplexen besteht. Am Respirationskomplex I (NADH-Dehydrogenase) und am Respirationskomplex II (Succinat-Dehydrogenase) werden Substrate aus dem Zitratzyklus reduziert. Am Respirationskomplex I geht dies mit dem Transport eines Protons aus der Matrix in den intermembranären Spalt einher (Pfeil schwarz). An beiden Respirationskomplexen wird je ein Elektron (Pfeil orange) auf Ubichinon übertragen und direkt zum Respirationskomplex III (Cytochrom c-Reduktase) transportiert. Am Respirationskomplex III werden die Elektronen (Pfeil orange) auf Cytochrom c übertragen und dabei Protonen (Pfeil schwarz) in den intermembranären Spalt gepumpt. Am Respirationskomplex IV (Cytochrom c-Oxidase) werden die Elektronen (Pfeil orange) vom Cytochrom c auf Sauerstoffmoleküle übertragen, die mit Protonen aus der Matrix zu Wasser reagieren. Die dabei freiwerdende Energie pumpt ebenfalls Protonen (Pfeil schwarz) aus der

Matrix in den intermembranären Spalt. Am Respirationskomplex V (ATP-Synthase) wird dann über den Rückstrom der Protonen in die Matrix (Pfeil schwarz) die benötigte Energie für die Bildung von ATP freigesetzt. Das ATP wird anschließend über ANT (ATP/ADP-Translokase; adenosin-nucleotide translocase) ins Zytosol transportiert. Im Gegenzug wird ein ADP aus dem Zytosol in die mitochondriale Matrix befördert. ANT wird auch als Bestandteil der mPTP diskutiert; sie soll den Kanalteil durch die innere Mitochondrienmembran bilden. VDAC (spannungsabhängiger Anionenkanal; voltage-dependent anion channel) bildet den Porenkomplex durch die äußere Membran, CypD (Cyclophilin D) bindet in der Matrix an ANT; diese Bindung ist für die Öffnung der mPTP essentiell.

In Muskelzellen gibt es zwei verschiedene mitochondriale Populationen (vgl. Abb. 1.3). Man unterscheidet zwischen den subsarkolemmalen Mitochondrien (SSM) und den inter(myo)fibrillären Mitochondrien (IFM), die zwischen den einzelnen Myofibrillen liegen und diese mit ATP versorgen [Palmer et al., 1977]. Palmer *et al.* konnten erstmals beide Subpopulationen aus dem Herzen getrennt gewinnen und führten als Unterscheidungskriterium die unterschiedliche Cristae-Struktur ein, die in SSM lamellenförmig, in IFM tubulär sein sollte [Palmer et al., 1977]. Dieses Kriterium wurde einige Jahre später von Riva *et al.* widerlegt, die in beiden Subpopulationen auch Mischformen zwischen lamellenförmiger und tubulärer Cristae-Struktur zeigen konnten [Riva et al., 2005]. Allerdings konnten beide Subpopulationen anhand ihrer funktionellen Eigenschaften unterschieden werden, denn der Sauerstoffverbrauch der IFM ist analog zur ATP-Produktion deutlich höher als der von SSM [Palmer et al., 1977]. Auch das Kalzium-Rückhaltevermögen, also die Kalzium-Konzentration, die Mitochondrien aufnehmen können ohne die Öffnung der mPTP zu induzieren, ist in IFM größer als in SSM [Palmer et al., 1986]. Da bis heute keine Proteomanalyse beider Subpopulationen durchgeführt wurde, konnten bisher keine Protein-Unterschiede nachgewiesen werden, die zur Charakterisierung der beiden Populationen dienen könnten.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Lokalisation von SSM und IFM in Herzmuskelzellen.**

Die SSM befinden sich direkt unter dem Sarkolemma, die IFM liegen zwischen den einzelnen Myofibrillen.

Die Effekte von Ischämie und Reperfusion auf die Funktion von SSM und IFM wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Der Sauerstoffverbrauch ab dem Respirationskomplex I war nach Hypoxie/Reoxygenierung in IFM erhöht und in SSM verringert, die Respiration ab dem Respirationskomplex II hingegen war für beide Populationen unverändert [Duan und Karmazyn, 1989]. Auch die Ischämie-induzierte Cardiolipin- und Cytochrom c-Freisetzung beschränkte sich auf SSM und geht dort mit einer erhöhten ROS-Produktion am Respirationskomplex III einher [Chen und Lesnefsky, 2006].

Mitochondrien spielen bei der ischämischen Präkonditionierung eine Schlüsselrolle (vgl. 1.2.2). ROS sind für die Vermittlung der Protektion zentral bedeutsam und werden unter anderem auch in der Atmungskette vor allem an den Respirationskomplexen I und III gebildet. Als mitochondrialer End-Effektor wird die Verzögerung der mPTP-Öffnung diskutiert (vgl. 1.2.2). Da in SSM und IFM der Sauerstoffverbrauch und das Kalzium-Rückhaltevermögen verschieden sind, stellt sich die Frage nach der Rolle von SSM und IFM bei kardioprotektiven Phänomenen.

### **1.3 Cx43 beim Myokardinfarkt und der Kardioprotektion**

Durch die elektrochemische Kopplung der Herzmuskelzellen werden auch bei ischämischen Ereignissen Signalstoffe zwischen benachbarten Zellen weitergeleitet. Daher ist die Rolle von Cx43 in der Ischämie sowie bei der Kardioprotektion von großer Bedeutung.

#### **1.3.1 Cx43 und Präkonditionierung**

Direkt zu Beginn einer akuten Ischämie wird der Großteil des Gap Junction-bildenden Cx43 dephosphoryliert und von den Glanzstreifen an die Plasmamembran in die Grenzzone (border zone) zwischen dem minderdurchbluteten und dem nicht-ischämischen Gebiet oder ins Zytosol transloziert [Beardslee et al., 2000; Lampe et al., 2006; Severs et al., 2008]. Das lateralisierte Cx43 bildet an der Plasmamembran Halbkanäle. Ein kleinerer Anteil an Cx43, der nicht umverteilt wird, wird während der Ischämie verstärkt phosphoryliert (hyperphosphoryliert), vor allem am Serin 368 im Carboxy-Terminus von Cx43; die Leitfähigkeit dieser verbliebenen Gap Junction-Kanäle ist jedoch reduziert [Ek-Vitorin et al., 2006; Miura et al., 2010]. Dadurch bleibt zu Beginn der Ischämie die elektrische Zell-Zell-Kopplung mit einer reduzierten Leitfähigkeit erhalten [Severs et al., 2008]. Bei andauernder Ischämie (15-20 Minuten) nimmt die Leitfähigkeit weiter ab, sodass die Zellen elektrisch entkoppeln [Garcia-Dorado et al., 2004; Miura et al., 2010]; eine chemische Zell-Zell-Kopplung kann aber bei einer bis zu 60 Minuten andauernden Ischämie noch beobachtet werden [Knapp et al., 2005; Miura et al., 2010]. Durch ischämische Präkonditionierung wird die Ischämie-induzierte Dephosphorylierung von Cx43 reduziert [Miura et al., 2004; Schulz et al., 2003] und dadurch der Anteil an Cx43, der in der Ischämie an die Plasmamembran umverteilt wird, reduziert; dies verzögert die elektrische und chemische Entkopplung benachbarter Zellen um 5-10 Minuten [Jain et al., 2003; Miura et al., 2010]. Mit der ischämischen Präkonditionierung wird eine erhöhte Kollokalisierung von Proteinkinasen, vor allem von PKC, mit Cx43 beobachtet, wodurch die Gap Junction-Kanal-Leitfähigkeit verringert wird [Miura et al., 2010]. Die pharmakologische Schließung der Gap Junction-Kanäle durch Heptanol verhindert die Infarktgrößenreduktion durch ischämische Präkonditionierung [Li et al., 2002]. Für die Vermittlung der ischämischen Präkonditionierung ist Cx43 essentiell, denn verglichen mit Wildtyp-Mäusen war die Infarktgröße in Cx43-defizienten Tieren durch ischämische Präkonditionierung nicht reduziert [Schwanke et al., 2002]. Der Schutz

durch ischämische Präkonditionierung ist allerdings nicht alleine abhängig von Gap Junction-Kanälen, da eine Protektion auch in isolierten Herzmuskelzellen nachweisbar ist und diese in Kardiomyozyten mit reduziertem Cx43-Gehalt verloren geht [Li et al., 2003]. Dies impliziert eine weitere intrazelluläre Lokalisation von Cx43.

### **1.3.2 Cx43 in Mitochondrien**

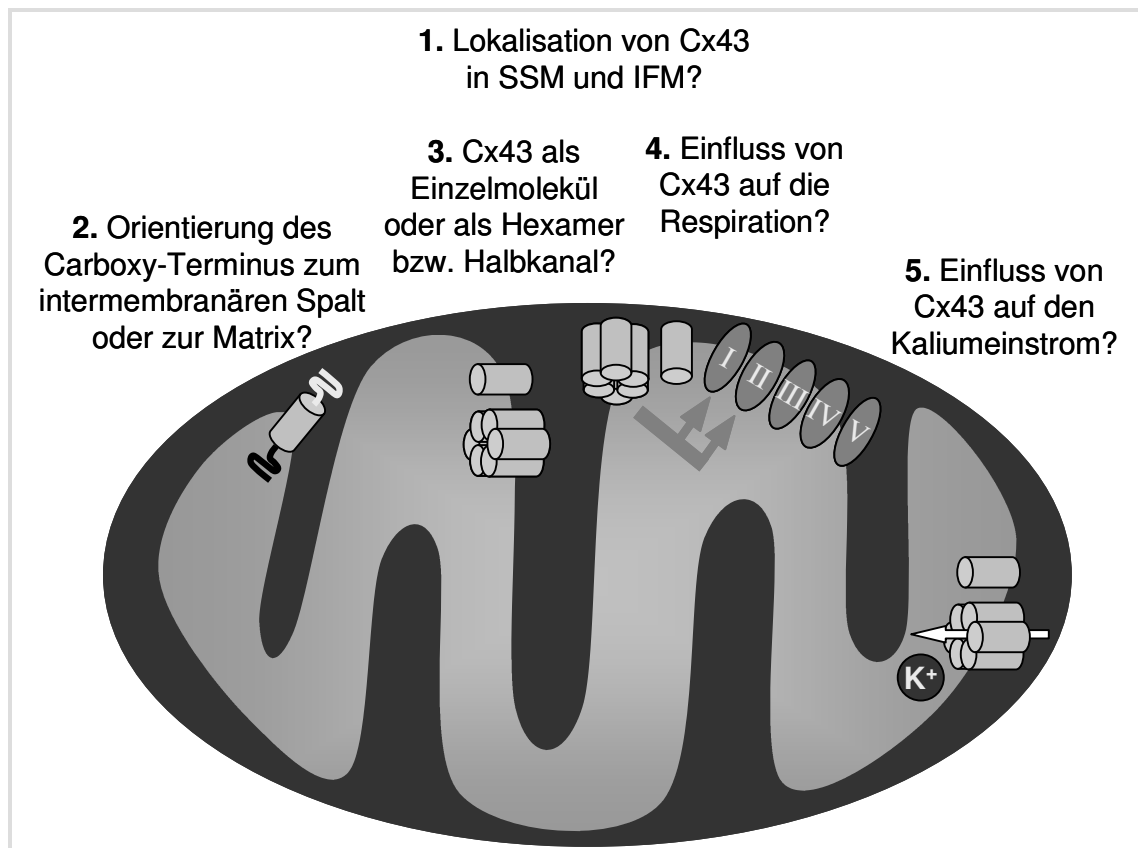
Neben der Lokalisation von Cx43 an der Plasmamembran wurde Cx43 in Mitochondrien von Endothelzellen [Li et al., 2001] und Nukleus-assoziiert in HeLa-Zellen und Kardiomyozyten nachgewiesen [Dang et al., 2003]. Mit Hilfe von FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Analysen, Elektronenmikroskopie, Western Blot-Analysen und Immunhistochemie wurde Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran von SSM aus Kardiomyozyten gefunden [Boengler et al., 2005]. Der Cx43-Import in die Mitochondrien erfolgt Hsp90 (Hitzeschockprotein 90; heat shock protein 90)-abhängig über den TOM20 (Translokase durch die äußere Membran 20; translocase of the outer membrane 20)-Transportweg [Rodriguez-Sinovas et al., 2006]. Durch Behandlung mit Geldanamycin, einem Blocker der Hsp90-Cx43-Interaktion, wurde der mitochondriale Cx43-Gehalt um etwa 30 % reduziert; die nachfolgende Diazoxid-Gabe reduzierte die Infarktgröße isolierter Rattenherzen nicht [Rodriguez-Sinovas et al., 2006]. Auch der Verlust der Diazoxid-induzierten Präkonditionierung in heterozygoten Cx43<sup>+/-</sup>-Mäusen und die verringerte Diazoxid-induzierte ROS-Produktion in Kardiomyozyten aus Cx43-defizienten Mäusen sprechen für die Wichtigkeit der mitochondrialen Cx43-Lokalisation für den Präkonditionierungs-Mechanismus [Heinzel et al., 2005].

Cx43 konnte bisher in der inneren Membran von SSM nachgewiesen werden, eine Cx43-Translokation in IFM wurde bislang aber ebenso wenig untersucht wie die Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran und die potentielle Bildung von Halbkanal-Strukturen. Funktionell scheint es einen Zusammenhang zwischen Cx43, dem mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal und der ROS-Produktion zu geben, ob dieser durch eine direkte oder eine indirekte Interaktion verursacht wird, ist bislang ebenfalls nicht geklärt.

### **1.4 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung 1) des Cx43-Gehaltes in IFM, 2) der Orientierung von Cx43 innerhalb der inneren Mitochondrienmembran und 3) einer potentiellen Cx43-Hexamer- bzw. Halbkanal-Bildung. Des Weiteren soll die

funktionelle Beteiligung von Cx43 an 4) der mitochondrialen Respiration sowie 5) am KaliumEinstrom in die mitochondriale Matrix untersucht werden (siehe Abb. 1.4).



**Abb. 1.4:** Die Zielsetzungen dieser Arbeit.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

|  |                    |
|--|--------------------|
| 4-Hydroxy-Tamoxifen  | Sigma Aldrich      |
| 5x Green Go-Taq-Puffer                                     | Promega            |
| 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure (18 $\alpha$ GA)           | Sigma Aldrich      |
| 100 bp DNA-Marker 1 $\mu$ g/ $\mu$ l                       | Invitrogen         |
| Adefofix Part 1 Fixierkonzentrat                           | Adefo-Chemie GmbH  |
| Adenosindiphosphat   | Sigma Aldrich      |
| Adenosintriphosphat  | Sigma Aldrich      |
| Albumin Standard   | Thermo Scientific  |
| Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk                    | BioRad             |
| Calcium green 5N   | Invitrogen         |
| Carbenoxolon   | Sigma-Adlrich      |
| Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail                  | Roche              |
| Cyclosporin A  | Sigma Aldrich      |
| Dimethylsuberimidat (DMS)                                  | Pierce             |
| DNA Typing Grade 50x TAE-Puffer                            | Gibco              |
| dNTP-Mix (dATP dCTP dGTP, dTTP)                            | Promega            |
| Enfluran   | ABCR GmbH & Co. KG |
| Entwickler Neutrol WA                                      | Agfa               |
| Ethidiumbromid 1 %   | Roth               |
| HärtelösungX für Fixierbäder                               | Adefo-Chemie GmbH  |
| Heptanol   | Sigma Aldrich      |
| K <sup>+</sup> -bindendes Benzofuran-Isophthalat (PBFI-AM) | Invitrogen         |
| LE-Agarose   | Biozym             |
| Lucifer Gelb Di-Lithium-Salz                               | Sigma Aldrich      |
| LumiGLO <sup>®</sup> Reagenz (20x) & Peroxide (20x)        | Cell Signaling     |
| NuPAGE Transferpuffer (20x)                                | Invitrogen         |
| Ponceau S Lösung   | Serva              |
| Protease-Inhibitor-Cocktail                                | Sigma Aldrich      |
| Proteinmarker Precision Plus Protein <sup>™</sup>          | BioRad             |
| Rhodamin123  | Sigma Aldrich      |

|   |                |
|---|----------------|
| Rhodamin B-Isothiocyanat-Dextran<br>(RITC-Dextran)      | Sigma Aldrich  |
| Rinderserumalbumin (BSA)                                | Sigma Aldrich  |
| Rotenon   | Sigma Aldrich  |
| SuperSignal West Femto Maximum<br>Sensitivity Substrate | Pierce         |
| XT Reducing Agent (20x)                                 | BioRad         |
| XT Sample Buffer (4x)                                   | BioRad         |
| Zelllyse-Puffer 10x                                     | Cell Signaling |

Alle anderen Chemikalien wurden bei den Firmen Sigma-Aldrich, Roth oder Merck bestellt.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

|   |                      |
|---|----------------------|
| 200 µm Nylonnetz                            | Neolab               |
| Blotting Papier                             | Schleicher & Schuell |
| Criterion™ XT Precast Gele (10% Bis-Tris)   | Bio-Rad              |
| Hyperfilm ECL                               | Amersham             |
| NuPAGE 10 % BisTris-Gele                    | Invitrogen           |
| Teflonmembran                               | Strathkelvin         |
| Trans-Blot® Nitrozellulosemembrane (0,2 µm) | BioRad               |

Alle anderen Verbrauchsmaterialien wurden bei Eppendorff oder Nunc bestellt.

### 2.1.3 Kits

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| BioRad DC Protein Assay | BioRad |
|-------------------------|--------|

### 2.1.4 Geräte

|  |                   |
|--|-------------------|
| Digitaler Sonifier 450 D                   | Branson           |
| Elektrophorese-Kammern:                    |                   |
| Agarosegele: Wide mini Sub Cell GT         | BioRad            |
| SDS-Page: X Cell SureLock Novex mini       | Invitrogen        |
| Western Blot: X Cell Blot Module           | Invitrogen        |
| ELISA Microplate Reader Model 680          | Bio-Rad           |
| Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse | Varian            |
| Fluorometer SpectraMax Gemini XS           | Molecular Devices |
| Heizblock MHR 13                           | HLC               |



|   |                        |
|---|------------------------|
| Hypercassette™ RPN 13642                  | Amersham LifeScience   |
| ImageMaster VDS                           | Pharmacia Biotech      |
| Inverses Mikroskop IX70                   | Olympus                |
| Mastercycler gradient                     | Eppendorff             |
| pH-Meter Accumet Basic pH-Meter           | Fisher Scientific      |
| pH-Elektrode Blue Line 15 pH              | Schott Instruments     |
| Pipetten                                  | Eppendorf              |
| Polytron DiAx 600                         | Heidolph               |
| Potter S                                  | B Braun Biotechnologie |
| 15 ml Glaspotter mit Teflonpistill        | Sartorius              |
| Probenzerkleinerungsmaschine MM 301       | RETSCHE                |
| Quarz-Küvetten 3/MS/Q                     | Starna                 |
| Reinstwasseranlage Milli-Q Advantage A 10 | Millipore              |
| Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ         | Strathkelvin           |
| Spannungsgeber:                           |                        |
| Blue Power 500                            | Serva                  |
| PS 9009 TC                                | Life Technologies      |
| Ultra-Turrax T25                          | Ika                    |
| Dispergierwerkzeug S25 N                  | Ika                    |
| Umwälzbad Respirationskammer F25          | Julabo                 |
| Umwälzbad Kardiomyozytenisolierung F10    | Julabo                 |
| Vortex MS1 Minishaker                     | Ika                    |
| Waagen 770                                | Kern                   |
| P1000N                                    | Mettlet                |
| Zentrifugen Biofuge Fresco                | Heraeus                |
| Megafuge 11 R                             | Heraeus                |
| Discovery M120 SE                         | Sorvall                |

### 2.1.5 Antikörper und Enzyme

|  |                  |
|--|------------------|
| 70 kDa UE des Respirationskomplex II (COXII) | Molecular Probes |
| Maus monoklonal anti-Mensch                  |                  |
| Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen IgG     | Molecular Probes |
| Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG          | Molecular Probes |
| ATP-Synthase $\alpha$ monoklonal anti-Mensch | BD Transduction  |
| Collagenase Typ I und II                     | Roche            |

**Cx43-Antikörper:**

|  |                 |
|--|-----------------|
| Cx43 polyklonal  | Zymed           |
| Cx43 polyklonal anti-Ratte   | Invitrogen      |
| Cyclophilin D (CyPD) monoklonal anti-Ratte                                 | Mitoscience     |
| Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase<br>monoklonal anti-Mensch (gapDH)   | Hytest          |
| GoTaq-DNA-Polymerase   | Promega         |
| Manganese superoxide dismutase (MnSOD)                                     | Upstate         |
| Kaninchen polyklonal anti-Mensch   |                 |
| Nagarse  | Sigma Aldrich   |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase monoklonal anti-Kaninchen          | Upstate         |
| Peroxidase konjugierter Pferd anti-Maus IgG                                | Cell Signalling |
| Peroxidase konjugierter Ziege anti-Kaninchen<br>IgG                        | Cell Signalling |
| Proteinase K   | Sigma Aldrich   |
| Uncoupling protein 3 (UCP3) Kaninchen<br>polyklonal anti-Ratte             | Biozol          |
| Voltage-dependent anion channel (VDAC)<br>Kaninchen polyklonal anti-Mensch | Abcam           |

**2.1.6 Tiere und Tierhaltung**

Die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Labortiere stammten entweder von Charles River oder aus Zuchten des zentralen Tierlabors unter der Leitung von PD Dr. Hilken. Alle Tiere wurden dort in einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Die Raumtemperatur von 21 °C sowie die Luftfeuchtigkeit waren konstant und die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Für Organentnahmen wurden folgende Tiere verwendet:

- männliche Lewis-Ratten im Alter von 2-5 Monaten;
- in Kooperation mit dem Labor von David Garcia-Dorado männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 2-5 Monaten;
- Cx43<sup>fl/fl</sup>- und Cx43<sup>Cre-ER(T)/fl</sup>-Mäuse; gemischter Hintergrund C57BL/6J, 129P2 und OlaHsd [Eckardt et al., 2004];
- Cx43-Knockout-Cx32-Knockin-Mäuse (ab jetzt mit Cx32 abgekürzt); gemischter Hintergrund C57BL/6 und 129P2 [Plum et al., 2000].

### 2.1.7 PCR-Primer

- Typisierung der Cx43<sup>fl/fl</sup> und Cx43<sup>Cre-ER(T)/fl</sup>-Mäuse:
 

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| Cre26 | 5' CCT GGA AAA TGC TTC TGT CCG 3'   |
| Cre36 | 5' CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC 3'   |
| UMP   | 5' TCA TGC CCG GCA CAA GTG AGA C 3' |
| UMPR  | 5' TCA CCC CAA GCT GAC TCA ACC G 3' |
- Typisierung der Cx32-Mäuse:
 

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| Cx32HO2 | 5' CGT CTT CAC TGT CTT TAT GCT CGC 3' |
| Cx43HO2 | 5' CGC AAT TAC AAC AAG CAA GCC AGC 3' |
| Cx43RO4 | 5' CGC CTC ATT ACT GAG GTT GTT GAG 3' |

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

#### 2.1.8.1 DNA-Isolierung

|             |   |
|-------------|---|
| TE-Puffer   | 10 mM Tris pH 8,0<br>1 mM EDTA              |
| TNES-Puffer | 50 mM Tris pH 7,5<br>1 mM EDTA<br>0,5 % SDS |

#### 2.1.8.2 Isolierung von Zellen und Zellorganellen

##### Isolierung von Kardiomyozyten

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Isolierungslösung           | 120 mM NaCl<br>5,4 mM KCl<br>1,2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>1,2 mM MgSO <sub>4</sub><br>11,2 mM Glukose<br>20 mM NaHCO <sub>3</sub><br>10 mM 2,3-Butandion-2-Monoxim<br>5 mM Taurin<br>pH 7,4 durch Begasung: 95 % O <sub>2</sub> /5 % CO <sub>2</sub> |
| Isolierungslösung + Kalium  | Isolierungslösung + 27 mM KCl  |
| Isolierungslösung + Kalzium | Isolierungslösung + 0,025 mM CaCl <sub>2</sub>   |

##### Isolierung von SSM nach [Holmuhamedov et al., 1998]

|           |                                  |
|-----------|----------------------------------|
| 0,5 % BSA | 0,5 % w/v in Mitochondrienpuffer |
|-----------|----------------------------------|

|                     |  |
|---------------------|--|
| 30 % Percoll-Lösung | 30 % Percoll in Mitochondrienpuffer, steril<br>filtriert   |
| Mitochondrienpuffer | 250 mM Sucrose<br>10 mM HEPES<br>1 mM EGTA<br>pH 7,4   |
| oder                |  |
| 17 % Percoll        | 17 % Percoll in Isolationspuffer   |
| Isolationspuffer    | 200 mM Mannitol<br>10 mM HEPES<br>1 mM EGTA<br>1 mM EDTA<br>5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>1 mM PMSF<br>5 mM NaF<br>1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$<br>Protease Inhibitor Cocktail<br>pH 7,2 |
| 0,1 % BSA           | 0,1 % BSA w/v in Isolationspuffer  |

#### **Isolierung von SSM und IFM nach [Judge et al., 2005]**

|                     |   |
|---------------------|---|
| Isolierungspuffer A | 100 mM KCl<br>50 mM MOPS<br>5 mM $\text{MgSO}_4$<br>1 mM ATP<br>1 mM EGTA<br>pH 7,4 |
| Isolierungspuffer B | Isolierungspuffer + 0,04% BSA   |

### **2.1.8.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **Lysepuffer**

|                |  |
|----------------|--|
| SDS-Lysepuffer | 68,5 mM Tris<br>2 % SDS<br>10 % Glycerol<br>pH 6,8 |
|----------------|--|

|               |                   |
|---------------|-------------------|
| Zellysepuffer | 10x Zellysepuffer |
|               | 7x Complete Mini  |

**Puffer für „Cross-Linking“**

|                           |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| Bicarbonat-Puffer         | 2 mM NaHCO <sub>3</sub>     |
|                           | 1 mM EDTA                   |
|                           | Protease Inhibitor-Cocktail |
|                           | pH 8,6                      |
| „Cross-Linking“ Puffer    | 20 mM Triethanolamin        |
|                           | 20 mM EDTA                  |
|                           | 10 mM DTT                   |
|                           | pH 8                        |
| Dodecyl-D-Maltosid-Puffer | 2 % Dodecyl-D-Maltosid      |
|                           | 20 mM Triethanolamin        |
|                           | 1 mM EDTA                   |
|                           | 10 mM DL-DTT                |

**Puffer für SDS-PAGE und Western Blot**

|                |                  |
|----------------|------------------|
| MOPS-Puffer    | 100 mM MOPS      |
|                | 100 mM Tris      |
|                | 6,93 mM SDS      |
|                | 20,5 mM EDTA     |
| Transferpuffer | 20x NUPAGE       |
|                | 20 %v/v Methanol |

**Puffer für Antikörperdetektion**

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| Blockierlösung   | 5 % Milchpulver in TBS-T |
| Stripping-Puffer | 62,5 mM Tris pH 6,8      |
|                  | 2 % SDS                  |
|                  | 100 mM Mercaptoethanol   |
| TBS              | 10 mM Tris               |
|                  | 150 mM NaCl              |
|                  | pH 7,6                   |
| TBS-T            | 0,1 % Tween-20 in TBS    |

### 2.1.8.4 Untersuchung der Mitochondrienfunktion

#### Puffer für Mitochondrienfunktion

|                        |                                  |
|------------------------|----------------------------------|
| Elektrolytlösung       | 300 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ |
|                        | 200 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$  |
|                        | 140 mM KCl                       |
|                        | AgCl gesättigt                   |
|                        | 0,1 % $\text{NaN}_3$             |
| Inkubationspuffer      | 125 mM KCl                       |
|                        | 10 mM MOPS                       |
|                        | 1,2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$  |
|                        | 1,2 mM $\text{MgCl}_2$           |
|                        | 20 $\mu\text{M}$ EGTA            |
| Respirationskomplex I  | Inkubationspuffer mit            |
|                        | 5 mM Glutamat                    |
|                        | 2,5 mM Malat                     |
| oder                   |                                  |
| Respirationskomplex II | Inkubationspuffer mit            |
|                        | 5 mM Succinat                    |
|                        | 2 $\mu\text{M}$ Rotenon          |

#### Puffer für Kalium-Messung

|                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| Kalium-freier Puffer | 250 mM Sucrose         |
|                      | 25 mM Tris             |
|                      | 2 mM EGTA              |
|                      | 5 mM $\text{MgCl}_2$   |
|                      | 2 mM ATP               |
|                      | pH 7,2                 |
| Kontroll-Puffer      | 140 mM NaCl            |
|                      | 3,6 mM KCl             |
|                      | 1,2 mM $\text{MgSO}_4$ |
|                      | 1 mM $\text{CaCl}_2$   |
|                      | 20 mM HEPES            |
|                      | 5 mM Glukose           |
|                      | pH 7,4                 |

|            |  |
|------------|--|
| TEA-Puffer | 200 mM Sucrose                               |
|            | 50 mM Tetraethylammonium (TEA <sup>+</sup> ) |
|            | 25 mM Tris                                   |
|            | 2 mM EGTA                                    |
|            | 5 mM MgCl <sub>2</sub>                       |
|            | 2 mM ATP                                     |
|            | pH 7,2                                       |

### **Mitochondriale Farbstoffaufnahme**

|                             |                                      |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Isoosmotischer Kaliumpuffer | 150 mM KCl                           |
|                             | 7 mM NaCl                            |
|                             | 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|                             | 1 mM MgCl <sub>2</sub>               |
|                             | 6 mM MOPS                            |
|                             | 6 mM Succinat                        |
|                             | 0,25 mM ADP                          |
|                             | 0,5 µM Rotenon                       |
|                             | pH 7,2                               |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Genotypisierung der Mäuse**

#### **Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien**

Die verschiedenen transgenen Mäuse wurden nach der Trennung von den Elterntieren genotypisiert. Dazu wurden die Mäuse nummeriert und dabei eine Schwanzbiopsie entnommen, aus der die DNA zur Genotypisierung gewonnen wurde.

Die Schwanzbiopsien wurden in TNES-Puffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K für 16 bis 24 Stunden bei 55 °C verdaut. Nach Zugabe von 1 M NaCl wurde der Ansatz kräftig geschüttelt und anschließend bei 13000 g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde das gleiche Volumen eiskalten Ethanol zum Überstand zugegeben und die DNA durch vorsichtiges schwenken sichtbar gemacht. Nach Pelletieren der DNA und einer kurzen Trockenzeit wurde diese in TE-Puffer bei 65 °C gelöst und schließlich für die PCR weiter verwendet oder bei 4 °C gelagert.

### PCR (Polymerase Chain Reaction)

Für jede PCR mussten die Reaktionsbedingungen neu definiert und getestet werden. Zur Unterscheidung der Cx43<sup>fl/fl</sup>- und Cx43<sup>Cre-ER(T)/fl</sup>-Mäuse waren die Reaktionsansätze UMPR und CRE26/36 nötig, zur Unterscheidung der Cx43-Wildtyp, der Cx43/Cx32- und der homozygoten Cx32-Mäuse waren die Reaktionsansätze Cx43HO2 und Cx32HO2 notwendig (siehe Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1: Reaktionsansätze für die Genotypisierungs-PCR.**

|   | UMPR           | CRE 26/36       | Cx43HO2           | Cx32HO2           |
|---|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Primer 1                                  | UMP<br>1,5 µl  | Cre26<br>0,5 µl | Cx43RO4<br>0,2 µl | Cx43RO4<br>0,2 µl |
| Primer 2                                  | UMPR<br>1,5 µl | Cre36<br>0,5 µl | Cx43HO2<br>0,1 µl | Cx32HO2<br>0,2 µl |
| 0,2 µl 5x Green Go Taq<br>Reaktionspuffer | 5 µl           | 5 µl            | 2,5 µl            | 2,5 µl            |
| dNTPs 10 mM                               | 0,5 µl         | 0,4 µl          | 0,5 µl            | 0,5 µl            |
| Go Taq DNA-<br>Polymerase 500 U/µl        | 0,2 µl         | 0,2 µl          | 0,2 µl            | 0,2 µl            |
| DNA-Matrize                               | 2 µl           | 2 µl            | 1 µl              | 1 µl              |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM                   | 1 µl           | -               | 1,75 µl           | 1,75 µl           |
| Wasser                                    | 13,3 µl        | 16,4 µl         | 17,6 µl           | 17,5 µl           |
| Summe                                     | 25 µl          | 25 µl           | 23,85 µl          | 23,85 µl          |

Nach der PCR wurden die Produkte bei 4 °C gelagert oder sofort elektrophoretisch untersucht (vgl. Tabelle 2.2). Zur Auftrennung der gewonnenen PCR-Fragmente wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer angesetzt, kurz aufgekocht, mit 3 % Ethidiumbromid versetzt und noch warm gegossen. Nach Elektrophorese mit 100 V für etwa 45 Minuten in TAE-Puffer wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente unter UV-Licht detektiert.

**Tabelle 2.2: Reaktionsschema für die Genotypisierungs-PCR.**

|                         | UMPR           | CRE 26/36       | Cx43HO2/Cx32HO2 |
|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Einmalige Denaturierung | 95 °C, 5 min   | 94 °C, 2 min    | 95 °C, 5 min    |
| Denaturierung           | 92 °C, 1 min   | 94 °C, 0,75 min | 94 °C, 0,5 min  |
| Annealing               | 65 °C, 1,5 min | 61 °C, 1 min    | 65 °C, 0,75 min |
| Neusynthese             | 72 °C, 2,5 min | 72 °C, 1 min    | 72 °C, 1,5 min  |
| Anzahl Zyklen           | 35             | 40              | 40              |
| Halte-Temperatur        | 4 °C           | 4 °C            | 4 °C            |



## **Behandlung der Mäuse**

Zur Reduktion des Cx43-Gehaltes wurde Cx43<sup>Cre-ER(T)/fl</sup>-Mäusen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen je 3 mg 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) intraperitoneal verabreicht. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge 4-OHT auch Cx43<sup>fl/fl</sup>-Mäusen appliziert. Das 4-OHT wurde dafür in DMSO gelöst und mit Sonnenblumenöl weiter verdünnt. Die Tiere wurden 11-12 Tage nach der ersten Injektion experimentell untersucht. Bei Verletzungen der Tiere oder schlechtem Habitus wurden die Tiere vorzeitig getötet.

### **2.2.2 Isolierung von Zellen und Zellorganellen**

#### **Isolierung von Kardiomyozyten**

Zur Isolierung intakter Kardiomyozyten mussten diese aus dem Gewebeverband herausgelöst werden.

Dazu wurden die Mäuse zur Verhinderung der Blutgerinnung 30 Minuten vor der Herzentnahme heparinisiert, das Herz unter Narkose entnommen und in eiskalten Isolierungspuffer mit Kalium überführt. Die Aorta wurde kanüliert und das Herz an einer Langendorff-Apparatur mit 37 °C warmem Isolierungspuffer retrograd perfundiert. Nach 2 Minuten wurden jeweils 0,5 mg/ml Kollagenase Typ-I und Typ-II sowie 0,014 % Trypsin zugegeben und das Herz etwa 10 Minuten perfundiert. Danach wurde das Herz abgenommen, in eine Glaspetrischale mit 37 °C warmem Isolierungspuffer mit Kalzium überführt, aufgeschnitten und die Zellen durch vorsichtiges Schwenken freigesetzt. Zur Entfernung von überschüssigem Gewebe und Zellklumpen wurde die Zellsuspension über ein Netz mit 200 µm Porendurchmesser gefiltert. In einer Glasschale setzten sich die Zellen bei 37 °C auf dem Glasboden ab. Nach 15 Minuten wurde Kalzium langsam und schrittweise unter vorsichtigem Schwenken zugegeben, bis eine Konzentration von 1 mM erreicht war. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Labor von David Garcia-Dorado in Barcelona durchgeführt.

#### **Isolierung von SSM**

Die Mitochondrienisolierung [modifiziert nach Holmuhamedov et al., 1998] und alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Maus- oder Rattenherzen wurden nach der Entnahme in Mitochondrienpuffer gespült und anschließend die Vorhöfe entfernt. Der rechte Ventrikel wurde bei –80 °C gelagert; aus dem linken Ventrikel wurden die Mitochondrien isoliert.

Mit einer Schere wurden die Ventrikel in Mitochondrienpuffer zerkleinert und anschließend gespült, bis der Überstand nicht mehr blutig war. Danach wurde das Gewebe mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Bei anschließenden Funktionsuntersuchungen wurden diese beiden Schritte in Mitochondrienpuffer mit 0,5 % fettsäurefreiem BSA durchgeführt, ansonsten in Mitochondrienpuffer ohne BSA. Nach Zentrifugation bei 0,7 g für 10 Minuten wurde der mitochondrienhaltige Überstand bei 12200 g für 10 Minuten pelletiert, BSA-frei gewaschen und erneut bei 10300 g für 5 Minuten zentrifugiert.

Das Pellet wurde für Funktionsmessungen in einem kleinen Volumen Mitochondrienpuffer aufgenommen und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt. Für Western Blot-Experimente wurden die SSM in 300 µl Mitochondrienpuffer aufgenommen und über eine Dichtegradienten-Zentrifugation zusätzlich gereinigt, um Fragmente aus anderen Zellkompartimenten sowie strukturell zerstörte SSM zu entfernen.

Für die Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die SSM auf eine 30 %ige Percoll-Lösung geschichtet und mit 34000 g für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die untere Schicht enthielt strukturell intakte Mitochondrien und wurde vorsichtig abgenommen. Die SSM wurden zweimal mit Mitochondrienpuffer gewaschen. Für Proteinase K-Verdauexperimente wurden die SSM direkt weiter behandelt, für andere Western Blot-Experimente wurden die SSM sofort lysiert oder als Pellet bei –80 °C gelagert.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado wurden im Labor in Barcelona ebenfalls SSM isoliert. Dort wurden Mitochondrien aus Rattenherzen oder aber Herzen von Wildtyp- sowie von Cx32-Mäusen isoliert. Die Ventrikel wurden mit einem Teflon-Potter in Isolationspuffer mit BSA homogenisiert und die SSM ebenfalls durch verschiedene Zentrifugationsschritte isoliert. Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde in 17 %iger Percoll-Lösung bei 12500 g durchgeführt. Alle anderen Arbeitsschritte entsprachen dem zuvor aufgeführten Protokoll.

### **Isolierung von SSM und IFM**

Dieses Protokoll ermöglichte die gleichzeitige Isolierung von SSM und IFM aus einem Herzen [modifiziert nach Judge et al., 2005].

Die Mitochondrienisolierung und alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Maus- oder Rattenherzen wurden nach der Entnahme in Isolierungspuffer A gespült, die Vorhöfe entfernt und das Gewebe gewogen. Der

rechte Ventrikel wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert; aus dem linken Ventrikel wurden die mitochondrialen Subpopulationen isoliert.

Der Ventrikel wurde in 10 ml Isolierungspuffer A pro mg Gewebe mit einer Schere zerkleinert und anschließend fünfmal in einem Glaspotter mit Teflonpistill homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 800 g wurden die im Überstand befindlichen SSM bei 8000 g für 10 Minuten sedimentiert und schließlich für weitere Untersuchungen in einem kleinen Volumen Isolierungspuffer A resuspendiert. Zur Isolation der IFM wurde das Pellet der ersten Zentrifugation in 10 ml Isolierungspuffer B pro mg Gewebe resuspendiert, mit 8 U/mg Nagarse eine Minute auf Eis inkubiert und die angedauten Myofibrillen wurden durch fünfmaliges Homogenisieren mit dem Glaspotter geöffnet. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 800 g befanden sich die IFM im Überstand und wurden analog zu den SSM sedimentiert und gewaschen.

Für Western-Blot-Experimente wurden die Mitochondrien ebenfalls durch Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation weiter gesäubert (vgl. *Isolierung von SSM*).

### 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### „Cross-Linking“

Mit Hilfe des „Cross-Linkings“ werden *in situ* in sehr enger Nachbarschaft befindliche Proteine chemisch miteinander verbunden.

Isolierte SSM wurden mit Isolationspuffer gewaschen und anschließend in 5 mg/ml „Cross-Linking“-Puffer resuspendiert. Für das „Cross-Linking“ wurden 10 mM DMS pro mg Mitochondrien-Protein zugegeben und der Ansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abstopfung der Reaktion wurden 50 mM Glycin zugefügt und die Reaktionsprodukte mittels Western-Blot Analyse untersucht.

Gap junction angereicherte Plasmamembran-Fractionen dienten im „Cross-Linking“-Experiment als Referenz. Dazu wurden Ventrikel in eiskaltem Bikarbonat-Puffer zerkleinert und homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 48000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten wurde das Pellet in Dodecyl-D-Maltosid-Puffer aufgenommen und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Solubilisierte Membranen wurden bei 100000 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand analog zu den zuvor beschriebenen SSM mit DMS behandelt.

Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado in seinem Labor in Barcelona durchgeführt.

**Proteinase K-Verdau von SSM**

Zur Bestimmung der Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran wurden isolierte und über Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigte SSM aus Rattenherzen verwendet. Diese wurden in getrennten Ansätzen mit Proteinase K-Endkonzentrationen zwischen 0,1 und 50 µg/ml für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend sofort sedimentiert, in SDS-Lysepuffer resuspendiert und zur Abstopfung der Proteinase K-Verdauung 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 g wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Die Proben wurden aliquotiert und bei –80 °C gelagert oder gleich weiter verwendet.

**Proteinase K-Verdau von Mitoplasten**

Zur Generierung von Mitoplasten (Mitochondrien, bei denen die äußere Mitochondrienmembran abgetrennt wurde) wurden Dichtegradienten-aufgereinigte SSM mit 2,5 mM Digitonin versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Resuspendierung der Mitoplasten in Mitochondrienpuffer wurden diese portioniert und analog zum Absatz *Proteinase K-Verdau von SSM* mit Proteinase K (Dosisadaptiert) behandelt.

**Proteinlysate der Mitochondrien**

Mitochondrien-Pellets wurden frisch oder gefroren sofort mit Zelllysepuffer versetzt, zügig resuspendiert und anschließend für 10 Sekunden sonifiziert. Nach Zentrifugation bei 13000 g für 10 Minuten bei 4 °C wurde der Proteingehalt des Überstandes mit dem DC Protein Assay-Kit (BioRad) bestimmt und die Proben für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet oder aliquotiert bei –80 °C gelagert.

**Proteinlysate aus Herzgewebe**

Herzgewebe wurde nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurde das Gewebe entweder unter Stickstoff gemörsert oder in der Probenzerkleinerungsmaschine für 30 Sekunden mit einer Schlagfrequenz von 30 Hz pulverisiert. Das pulverisierte Herzgewebe wurde in Zelllysepuffer resuspendiert und für 10 Sekunden sonifiziert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 g wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Die Proben wurden für eine SDS-PAGE weiter verarbeitet oder aliquotiert bei -80 °C gelagert.

## **SDS-PAGE**

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine unabhängig von ihrer Ladung einzig nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch auf.

Dazu wurden 25-30 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Die Proteinmenge wurde mit Probenpuffer (BioRad) und Reduktionsmittel (BioRad) versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Als Größenstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (BioRad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in MOPS-Puffer bei 150-200V. Anhand des vorgefärbten Proteinstandards konnte die Elektrophorese bis zu einer definierten Proteingröße erfolgen.

## **Western Blot**

Nach Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe wurden die Proteine im Western Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden das SDS-Gel, die Nitrozellulosemembran und Blot-Papier in Transfer-Puffer äquilibriert und unter Puffer luftblasenfrei so übereinander gestapelt, dass die durch SDS negativ geladenen Proteine auf dem Weg zur Anode aus dem Gel heraus in die Nitrozellulosemembran wanderten. Der Transfer erfolgte durch Elektrophorese bei 30 mA für 1-2,5 Stunden.

## **Ponceau S-Färbung**

Ponceau S färbte unspezifisch alle Proteine und diente zur Kontrolle der Beladung oder zur Normierung des späteren Antikörper-Signals. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau-S-Lösung etwa 5 Minuten gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen, bis der Hintergrund minimal gefärbt war. Zu Dokumentationszwecken und für eine eventuelle spätere Normierung wurden die Membranen eingescannt. Anschließend wurde jede Membran in TBS-T entfärbt und bei –20 °C gelagert oder für die Antikörper-Detektion weiter verwendet.

## **Antikörperinkubation und Detektion**

Zur Reduktion von Antikörperbindungen an unspezifische Bindungsstellen wurde die Membran zuerst in Blockierlösung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden ebenfalls in Blockierlösung angesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert (Verdünnungen siehe Tabelle 2.3). Die in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper wurden bei –20 °C gelagert und mehrfach verwendet. Die Membran wurde mit TBS-T gespült und mit dem Sekundärantikörper in Blockierlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Verdünnungen siehe Tabelle 2.3). Dieser war gegen das Tier gerichtet, in dem der erste Antikörper produziert wurde und an HRP

(horse radish peroxidase) gekoppelt. Dieses Enzym reagierte dann mit seinem Substrat und setzte Lichtquanten (Chemilumineszenz) frei, die mit einem lichtempfindlichen Film detektiert wurden.

**Tabelle 2.3: Übersicht aller verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die verwendeten Verdünnungen.**

| Antikörper   | Firma           | Verdünnung |
|--|-----------------|------------|
| ATP-Synthase $\alpha$ Maus monoklonal anti-Mensch                          | BD Transduction | 1:1000     |
| Cx43 Kaninchen polyklonal anti-Ratte                                       | Invitrogen      | 1 :500     |
| Cyclophilin D (CyPD) Maus monoklonal anti-Ratte                            | MitoSciences    | 1:500      |
| Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Maus monoklonal anti-Mensch (gapDH) | Hytest          | 1:2000     |
| Manganese superoxide dismutase (MnSOD) Kaninchen polyklonal anti-Mensch    | Upstate         | 1:1000     |
| Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase Maus monoklonal anti-Kaninchen      | Upstate         | 1:1000     |
| Uncoupling protein 3 (UCP3) Kaninchen polyklonal anti-Ratte                | Biozol          | 1:500      |
| Voltage-dependent anion channel (VDAC) Kaninchen polyklonal anti-Mensch    | Abcam           | 1:1000     |
| Peroxidase konjugierter Pferd anti-Maus IgG                                | Cell Signalling | 1:10000    |
| Peroxidase konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG                           | Cell Signalling | 1:10000    |

### „Stripping“

Beim „Stripping“ wurden die Antikörper von der Membran abgelöst, um eine neue Antikörperbindung zu ermöglichen. Dazu wurde der Stripping-Puffer auf 54 °C erwärmt und die Membran für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich gewaschen und konnte so nach erneuter Inkubation mit Blockierlösung wieder eine Antikörperbindung eingehen.

### Antikörperdetektion an fixierten SSM

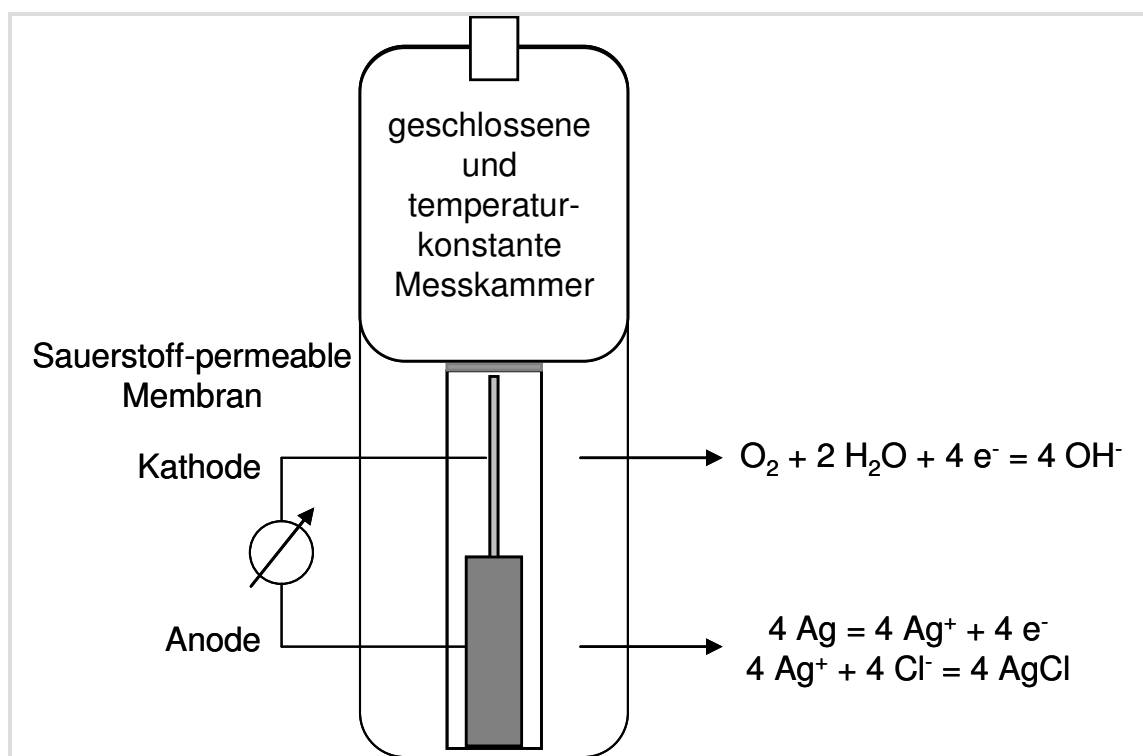
Zur Untersuchung der Cx43-Orientierung in der inneren Mitochondrienmembran wurden der Carboxy-Terminus von Cx43 sowie die zur Matrix hin gerichtete Untereinheit des Respirationskomplex II (COXII) über Immunfluoreszenz detektiert. Dabei wurde die Fluoreszenz von Cx43 in verschiedenen stark permeabilisierten Mitochondrien-Ansätzen mit der Fluoreszenz von COXII verglichen. Isolierte Ratten-SSM wurden in drei Ansätze aufgeteilt und unterschiedlich vorbehandelt. Der erste Ansatz wurde zur Entfernung der äußeren Membran mit 0,12 mg Digitonin pro mg Mitochondrien-Protein für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Alle drei Ansätze wurden dann mit 2 % Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert. Einer der beiden bislang nur fixierten Ansätze wurde anschließend mit 0,1 % Triton-X100 vollständig

permeabilisiert, sodass beide Membranen eliminiert wurden; daraus ergaben sich drei verschieden vorbehandelte Ansätze, ein nur fixierter Ansatz, einer, bei dem nur die äußere und ein dritter, bei dem beide Membranen entfernt wurden. Alle drei Ansätze wurden für 10 Minuten bei 40 °C in 50 mM Tris pH 9,6 mit 1 % Harnstoff inkubiert, um die nachfolgende Antikörper-Bindung zu optimieren. Nach Blockierung der Ansätze in Isolationspuffer mit 5 % Rinderserum und 0,1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden diese mit Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Die Fluoreszenzmessung mehrerer Replikate erfolgte im 96-well-Format in einem Fluorometer.

Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado in seinem Labor in Barcelona durchgeführt.

## 2.2.4 Untersuchung der Mitochondrienfunktion

### Respirationsmessung

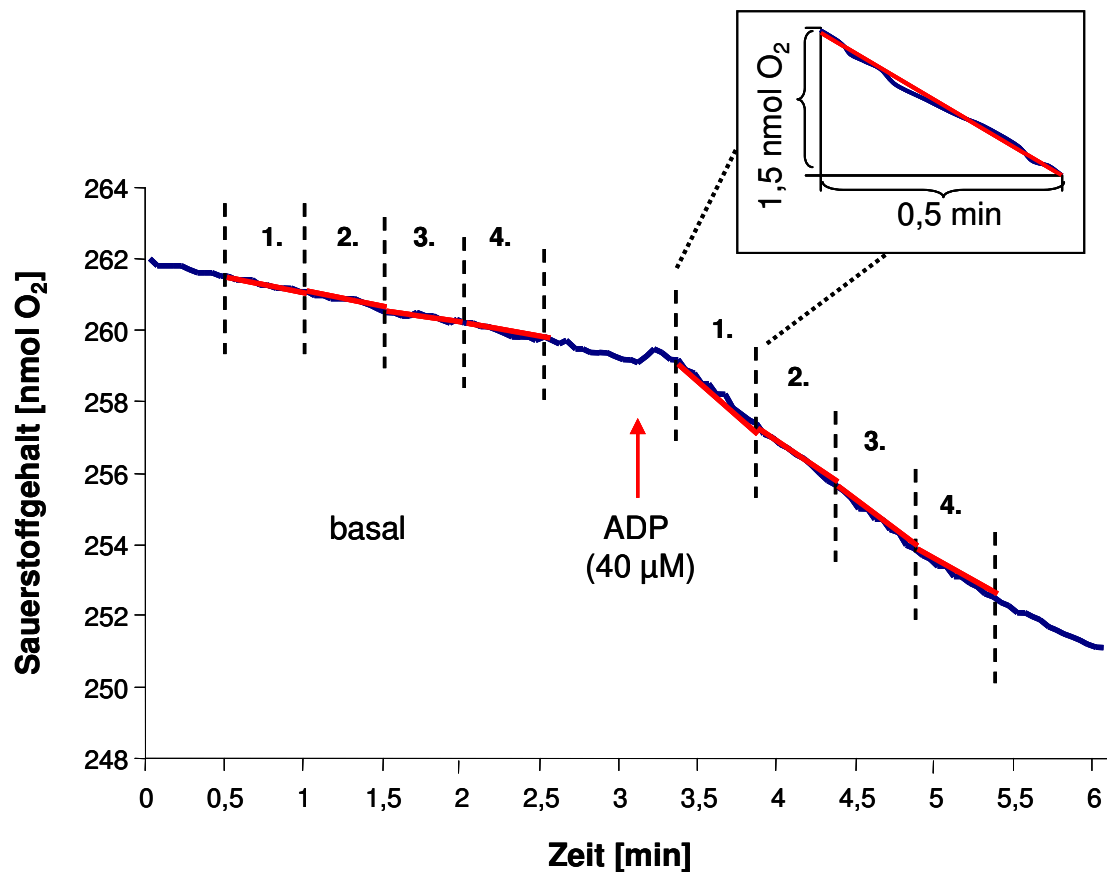


**Abb. 2.1: Mess-Schema einer Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ.**

Eine Sauerstoff-permeable Membran lässt den Sauerstoff aus der Messkammer zur Kathode durch, an der die eigentliche Reaktion stattfindet. An der Anode wird Silber reduziert und dabei ein Elektron frei, das zur Reduktion von Sauerstoff an der Kathode benötigt wird. Nimmt der Sauerstoffgehalt in der Messkammer ab, gelangt weniger Sauerstoff durch die Membran an die Kathode und es fließt weniger Strom.

SSM und IFM wurden wie beschrieben isoliert. Die Sauerstoffmessung erfolgte mit einer Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ in einem geschlossenen System bei konstanten 25 °C (vgl. Abb. 2.1).

Die Respiration wurde unter Verwendung von Substraten für den Respirationskomplex I oder den Respirationskomplex II bestimmt. Für die Messung wurden 50 µg/0,5 ml Mitochondrien-Protein in die Messkammer gegeben und der Sauerstoffgehalt in der Messkammer kontinuierlich gemessen. Durch den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien nahm der Sauerstoffgehalt in der Messzelle über die Zeit hinweg ab. Bei konstantem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch wurden 40 µM ADP zugegeben und der Sauerstoffgehalt in der Messkammer kontinuierlich weiter gemessen.



**Abb. 2.2: Ermittlung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches.**

Für die Ermittlung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches wurden jeweils die Steigungen des Sauerstoffabfalls in der Messkammer innerhalb von 0,5 Minuten-Abschnitten ermittelt. Die vier ermittelten Steigungen während der basalen Respiration sowie nach ADP-Zugabe wurden gemittelt und auf die eingesetzte Mitochondrien-Proteinmenge bezogen. Da der Sauerstoffgehalt in der Messkammer abnimmt, ist die Steigung negativ. Die Mitochondrien verbrauchen aber den Sauerstoff und deshalb wird die Steigung mit -1 multipliziert.

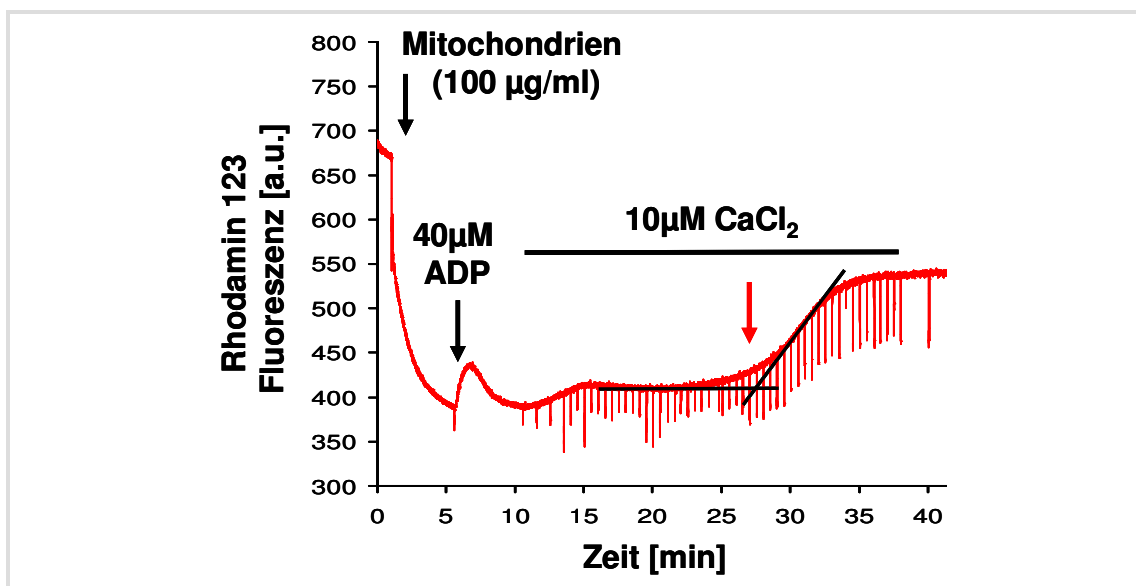


$$\begin{aligned} \text{Sauerstoffverbrauch} [\text{nmol O}_2 / \text{min} * \text{mg Protein}] &= \frac{\text{Sauerstoffmenge} [\text{nmol O}_2]}{\text{Zeit} [\text{min}] * \text{Proteinmenge} [\text{mg Protein}]} \\ &= \frac{(-) \text{Steigung} [\text{nmol O}_2]}{0,5 [\text{min}] * 0,05 \text{ mg Protein}} \end{aligned}$$

Zur Ermittlung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurde der Sauerstoffabfall über die Steigung in 0,5 Minuten-Abschnitten ermittelt und auf die eingesetzte Mitochondrien-Proteinmenge bezogen (vgl. Abb. 2.2).

Außerdem kann der Einfluss verschiedener Substanzen auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch direkt untersucht werden. Dazu wurden 100 µg/ml Mitochondrien-Protein in Inkubationspuffer mit Substraten für den Respirationskomplex I und mit 40 µM ADP in der Messkammer vorgelegt und der Sauerstoffgehalt gemessen. Direkt im Anschluss wurde der Einfluss von 18αGA, einem Cx43-Gap Junction- sowie auch Halbkanalblocker, in verschiedenen Konzentrationen oder dem Lösungsmittel DMSO auf die ADP-stimulierte Atmung untersucht. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch wurde erneut für die erste Minute direkt nach Zugabe von DMSO bzw. 18αGA ermittelt.

### Mitochondriales Membranpotential



**Abb. 2.3: Ermittlung der Kalzium-Konzentration, welche die Öffnung der mPTP induziert.**

Für die Ermittlung der Kalzium-Konzentration wurde der Punkt bestimmt, bei dem das Membranpotential zusammenbricht. In dem Kurvenabschnitt, in dem Kalzium zugegeben wurde, wurde der Schwellenwert gesucht, ab dem kontinuierlich Rhodamin 123 freigesetzt wurde. Dazu wurde der Schnittpunkt zweier Regressionsgeraden ermittelt, wobei die erste Regressionsgerade durch den linearen Bereich der Kalzium-Pulse vor dem Anstieg, die zweite durch den Bereich mit der größten Steigung gebildet wurde. Der Schnittpunkt zeigte den letzten

Kalzium-Puls an, der von den Mitochondrien aufgenommen werden konnte, bevor das Membranpotential verloren ging.

Für die Bestimmung der Kalzium-Konzentration, welche die Öffnung der mPTP induziert, wurde das Membranpotential der Mitochondrien bzw. dessen Verlust durch die dauerhafte Öffnung der mPTP gemessen. Dazu wurde der Fluoreszenz-Farbstoff Rhodamin 123 verwendet, der membranpotential-abhängig von Mitochondrien aufgenommen oder freigesetzt wurde. Für die Messung wurde ein Fluoreszenzspektrophotometer verwendet. Der Farbstoff wurde mit Licht der Wellenlänge von 503 nm angeregt und emittierte Licht mit 535 nm Wellenlänge.

In einer Küvette wurde Inkubationspuffer mit den Substraten Glutamat und Malat, 100 nM Rhodamin 123 und 5 mM Natriumchlorid vorgelegt. Nach einer Minute wurden 100 µg/ml SSM oder IFM zugegeben. Nach Applikation von 40 µM ADP nahmen die Mitochondrien dieses über die ADP/ATP-Translokase auf und gaben im Austausch ein ATP ab. Beim Ko-Transport von ADP (2 Phosphat-Reste, 3 negative Ladungen) und ATP (3 Phosphat-Reste, 4 negative Ladungen) wurden drei negative Ladungen in die Mitochondrien hinein und vier negative Ladungen hinaus transportiert, wodurch das Membranpotential verändert und Rhodamin 123 freigesetzt wurde. Bei intakter Mitochondrienfunktion wurde das Membranpotential schnell bis auf den Ausgangswert wiederhergestellt; dies war durch die erneute Rhodamin 123-Aufnahme sichtbar. Nach Erreichen eines stabilen Membranpotentials wurde die Porenöffnung durch minütliche Zugabe von 10 µM Kalziumchlorid induziert. Für die Ermittlung des Kalzium-Rückhaltevermögens wurden mathematisch zwei Regressionsgeraden ermittelt, deren Schnittpunkt dem Zeitpunkt des letzten Kalzium-Pulses entsprach, der von den Mitochondrien noch aufgenommen werden konnte ohne eine Porenöffnung zu induzieren (vgl. Abb. 2.3).

Des Weiteren wurde das Membranpotential der Mitochondrien gemessen und der Effekt des Cx43-Kanalblockers 18αGA quantifiziert. Dazu wurden 100 nM Rhodamin 123 und 5 mM Natriumchlorid in Inkubationspuffer mit den Substraten Glutamat und Malat vorgelegt. Nach Zugabe von 1 mg SSM wurde nach Erreichen eines stabilen Signals 18αGA in verschiedenen Konzentrationen oder dessen Lösungsmittel DMSO zugegeben.

### **Autofluoreszenz**

Für die Messung der Autofluoreszenz machte man sich die fluoreszierende Eigenschaft vor allem von NADH, aber auch von NADPH zu Nutze, welches durch

Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm angeregt wurde und Licht mit 460 nm Wellenlänge emittierte. Zuerst wurde die Grundfluoreszenz des Inkubationspuffers gemessen. Nach Zugabe von 1 mg isolierten SSM wurde bei Erreichen eines stabilen Signals der Cx43-Kanalblocker 18 $\alpha$ GA in verschiedenen Konzentrationen oder dessen Lösungsmittel DMSO zugegeben.

### **Mitochondriale Farbstoffaufnahme**

SSM wurden aus Wildtyp- sowie aus Cx32-Mauserherzen isoliert, zentrifugiert und in isoosmotischem Kaliumpuffer wieder aufgenommen. Die Mitochondrien wurden in drei Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz wurde für 5 Minuten mit 1  $\mu$ M des Cx43-Kanalblockers Carbenoxolon bei 25 °C inkubiert, beim zweiten Ansatz ließ man 10  $\mu$ M des Kanalblockers Heptanol ebenfalls 5 Minuten bei 25 °C einwirken. Der dritte Ansatz wurde zur Kontrolle ebenfalls 5 Minuten ohne Zusätze bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze mit 50  $\mu$ M des Cx43-Kanal-durchgängigen Farbstoffs Lucifer Gelb (LY CH) und 25  $\mu$ g/ml des Kanal-undurchlässigen Farbstoffs Rhodamin B-Isothiocyanat-Dextran (RITC-Dextran) versetzt und für 25 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die SSM wurden gewaschen und jeweils in Puffer mit den gleichen Blocker-Konzentrationen aufgenommen. Die Fluoreszenz von LY CH wurde bei 535 nm, die von RITC-Dextran bei 600 nm detektiert. In einer 96-well-Platte wurden mehrere Replikate jeder Probe gemessen. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado in seinem Labor in Barcelona durchgeführt.

### **Kaliumgehalt**

Für die Untersuchung des Kaliumgehaltes der mitochondrialen Matrix wurde der Fluoreszenzfarbstoff PBFI-AM verwendet. Dieser war an einen Acetoxymethyl-Ester (AM) gekoppelt und konnte eine Kalium-Bindung erst dann eingehen, wenn der Ester in den Mitochondrien von Esterasen abgespalten wurde.

Frisch isolierte Kardiomyozyten aus Wildtyp- sowie aus Cx32-Mauserherzen wurden in Laminin-beschichtete Kulturschalen mit Glasboden überführt und für 2,5 Stunden bei 37 °C mit 10  $\mu$ M des Farbstoffes PBFI-AM verdünnt in Kontroll-Puffer beladen. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ M Digitonin für 1 Minute permeabilisiert und sofort in TEA<sup>+</sup>-Puffer überführt, um das Kalium aus der mitochondrialen Matrix durch TEA<sup>+</sup> zu ersetzen. Nach 20 Minuten wurde der Puffer durch Kalium-freien Puffer ersetzt und die mitochondriale Kalium-Konzentration mit einem Invers-Mikroskop bei abwechselnder Anregung zwischen 340 nm und 380 nm gemessen.

Die Kaliumaufnahme der Mitochondrien wurde in Abwesenheit oder in Gegenwart von 2 mM ATP zur Blockade des mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal bestimmt; dazu wurde zweimal im Abstand von einer Minute Kaliumchlorid (20 mM) zugegeben.

Zur Analyse einer Cx43-Kanal-Abhängigkeit der Kaliumströme wurde in weiteren Experimenten der Effekt von 200 µM Diazoxid (ein mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffner) sowie von 10 µM 18αGA durch Zugabe vor dem ersten Kaliumpuls untersucht. Ein maximaler KaliumEinstrom wurde induziert, indem 45 nM Valinomycin (ein Kaliumionophor) und 40 mM Kaliumchlorid zugegeben wurden.

Zur Auswertung wurde das Verhältnis zwischen den beiden Anregungswellenlängen von PBFI berechnet. Der Kalium-Einstrom wurde durch die Erhöhung der PBFI-Fluoreszenz sichtbar und die Zunahme über die ersten 15 Sekunden nach jedem Kalium-Puls wurde ausgewertet.

Diese Untersuchung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado in seinem Labor in Barcelona durchgeführt.

### **2.3 Statistik**

Mit dem gepaarten oder ungepaarten t-Test wurden signifikante Unterschiede in Proteinanalysen, in Respirationsuntersuchungen, bei der Bestimmung des Kalzium-Rückhaltevermögens und des Membranpotentials ermittelt. Für die Bestimmung der Cx43-Orientierung wurde eine 2-Wege-ANOVA mit dem Programm SigmaStat Version 2.0 durchgeführt. Die im spanischen Labor unter der Leitung von David Garcia-Dorado durchgeführten Untersuchungen wurden mittels Mann-Whitney U Test oder einer 1-Wege-ANOVA mit der Software SPSS Version 11.0.0 auf signifikante Unterschiede überprüft.

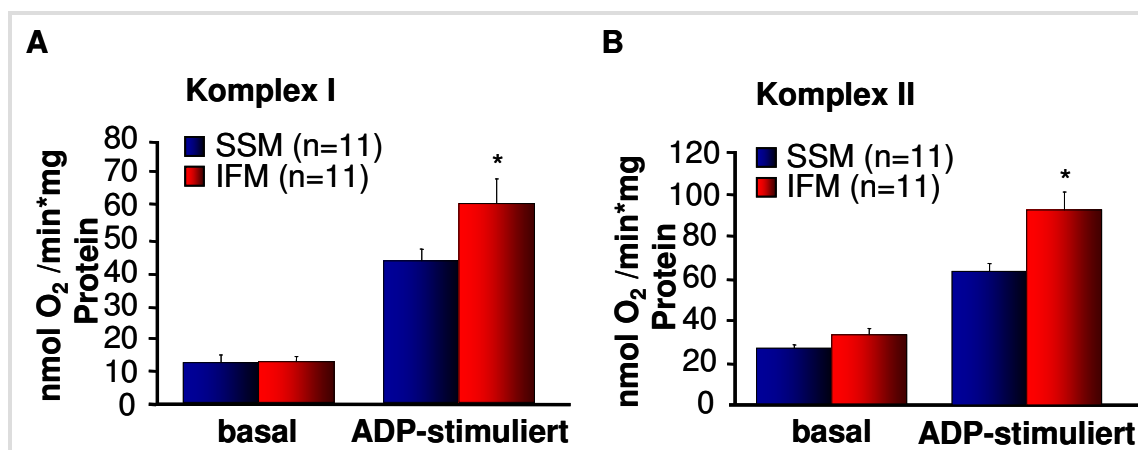
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Lokalisation von Cx43 in Mitochondrien

Bevor die isolierten SSM und IFM im Western Blot untersucht wurden, musste die Reinheit der beiden Populationen anhand funktioneller Unterschiede überprüft werden.

##### 3.1.1 Charakterisierung der SSM und IFM

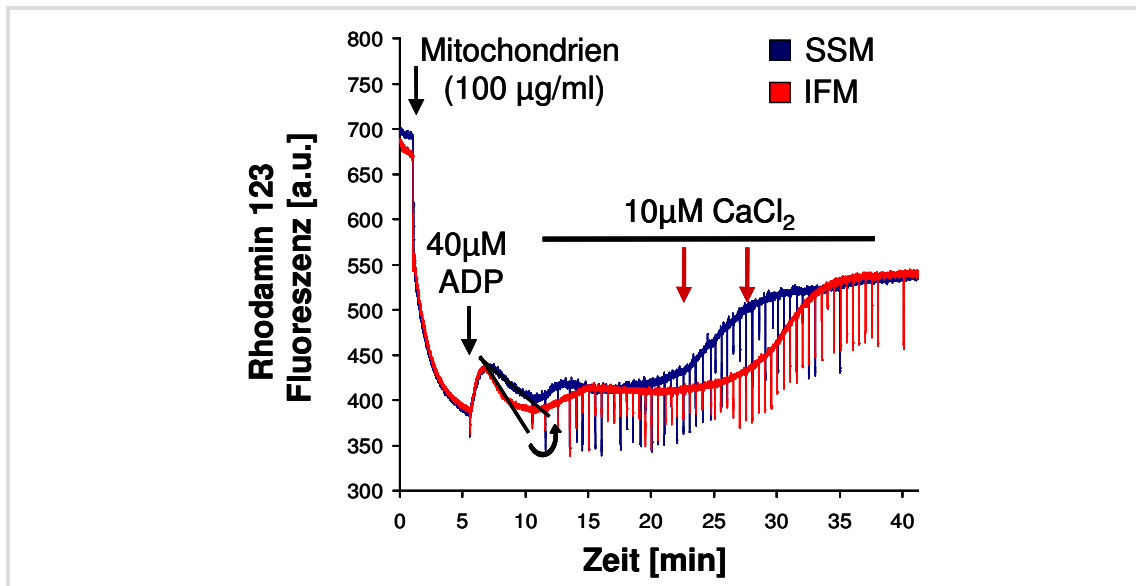
Die basale Atmung der SSM und der IFM war bei Verwendung der Substrate für den Respirationskomplex I sowie für den Respirationskomplex II jeweils vergleichbar. Der Sauerstoffverbrauch nach ADP-Stimulation war sowohl bei Zugabe der Substrate für den Respirationskomplex I als auch für den Respirationskomplex II in IFM signifikant höher als in SSM (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Sauerstoffverbrauch von SSM und IFM.**

(A) zeigt den Sauerstoffverbrauch mit Substraten für den Respirationskomplex I. Unter Zugabe von 40  $\mu$ M ADP wurde die stimulierte Respiration gemessen. (B) zeigt den Sauerstoffverbrauch mit Succinat unter Respirationskomplex I-Blockade mit Rotenon ohne und mit ADP-Stimulation. Dargestellt sind in beiden Abbildungen (n=11) der mittlere Sauerstoffverbrauch  $\pm$  SEM; \* signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$  zwischen SSM und IFM.

Mitochondrien können Kalzium aufnehmen und speichern. Wird aber eine bestimmte Matrix-Kalzium-Konzentration überschritten, öffnet sich die mPTP und das mitochondriale Membranpotential kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Dieses sogenannte Kalzium-Rückhaltevermögen ist für SSM und IFM verschieden [Palmer et al., 1986].



**Abb. 3.2: Bestimmung des Kalzium-Rückhaltevermögens.**

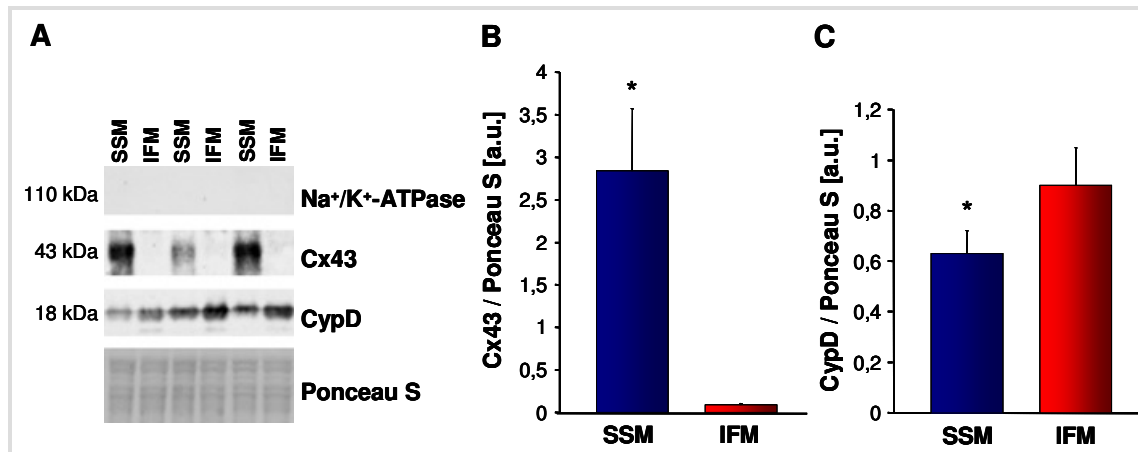
Die Abbildung zeigt eine typische Messkurve zur Bestimmung des Kalzium-Rückhaltevermögens von SSM und IFM unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 123. Ausgewertet wurde die Kalzium-Konzentration, bei der das Membranpotential verloren geht (rote Pfeile). Anhand der beiden schwarzen Geraden konnte die unterschiedliche Geschwindigkeit, mit der das Membranpotential nach Auslenkung durch ADP von den SSM oder den IFM wiederhergestellt wurde, bestimmt werden.

Abbildung 3.2 zeigt typische Messkurven zur Bestimmung des Kalzium-Rückhaltevermögens von SSM und IFM. Die Öffnung der mPTP wurde in den IFM bei höheren Kalzium-Konzentrationen verglichen mit den SSM induziert ( $167,0 \pm 11,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$  in IFM vs.  $145,5 \pm 9,6 \mu\text{M Ca}^{2+}$  in SSM;  $n=10$ ;  $p<0,05$ ). Die Zeit, welche die Mitochondrien benötigten, um nach ADP-Zugabe das Membranpotential wieder herzustellen, war zwischen SSM und IFM verschieden (Abb. 3.2) und korrelierte mit der erhöhten Respirationskapazität der IFM. In den IFM wurde das Membranpotential mit einer Geschwindigkeit von  $45,25 \pm 1,88$  Fluoreszenzeinheiten/min wieder hergestellt, in den SSM war die Rückkehr des Membranpotentials signifikant langsamer ( $31,48 \pm 2,01$  Fluoreszenzeinheiten/min;  $n=14$ ;  $p<0,05$ ).

### 3.1.2 Cx43 und IFM

Zur Untersuchung des Cx43-Gehaltes in IFM wurden Lysate isolierter SSM und IFM mittels Western Blot-Analyse untersucht. Abbildung 3.3 zeigt, dass Cx43 ausschließlich in SSM vorkommt. In IFM konnte nur bei sehr langer Exposition ein schwaches Cx43-Signal detektiert werden. Der Gehalt an Cyclophilin D war ebenfalls

in den Subpopulationen verschieden, in den SSM lag weniger Cyclophilin D vor als in den IFM.



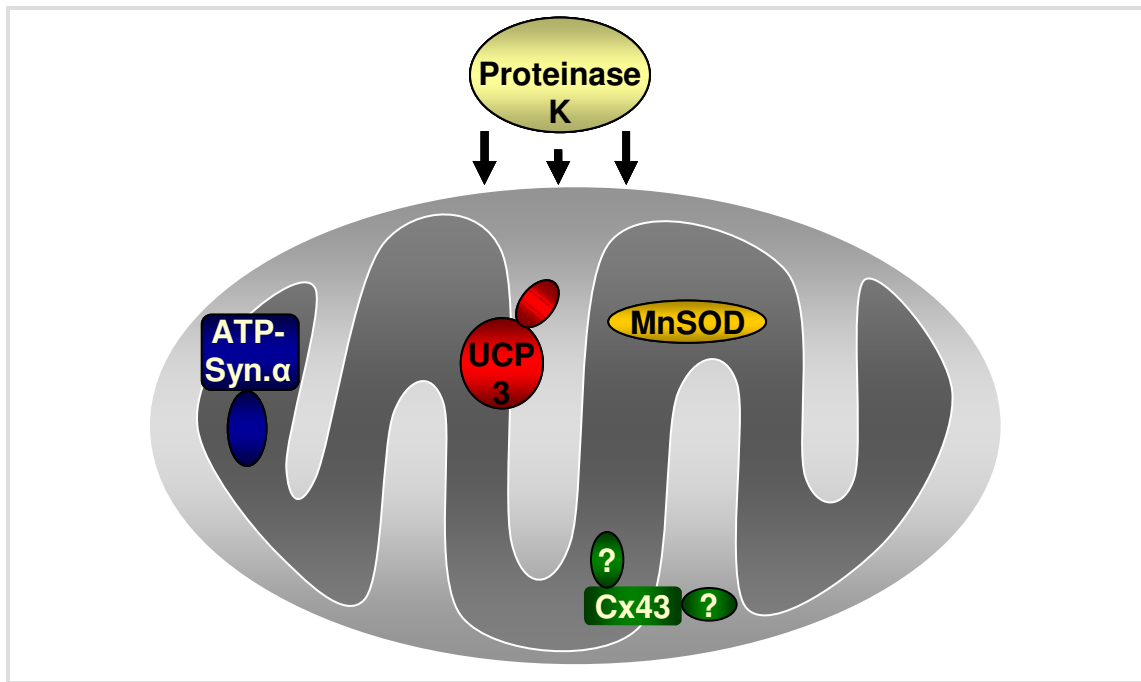
**Abb. 3.3: Cx43-Gehalt in SSM und IFM [Boengler et al., 2009].**

(A) zeigt einen typischen Western Blot von SSM und IFM. Durch die fehlende Antikörperreaktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase konnte eine Verunreinigung der isolierten Mitochondrien mit Sarkolemma ausgeschlossen werden. Untersucht wurden der Cx43- sowie der Cyclophilin D (CypD)-Gehalt. Die Ponceau S-Färbung zeigte die gleiche Beladung der einzelnen Spuren und diente zur internen Normierung der Antikörperreaktion. (B) zeigt die statistische Auswertung des Cx43-Signals, (C) des Cyclophilin-D-Signals in SSM und IFM bezogen auf das Ponceau S-Signal als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=6, \* signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$  zwischen SSM und IFM).

Da Cx43 nur in SSM vorlag, wurde in den weiteren Experimenten nur diese Mitochondrien-Population untersucht.

### 3.2 Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran von SSM

Zur Untersuchung der Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran wurden SSM in verschiedenen Verdau-Stadien generiert. Der Verdau mit Proteinase K war unspezifisch und verlief theoretisch gleichmäßig von außen nach innen. Durch die Verwendung geeigneter Markerproteine konnte dies überprüft werden (Abb. 3.4).



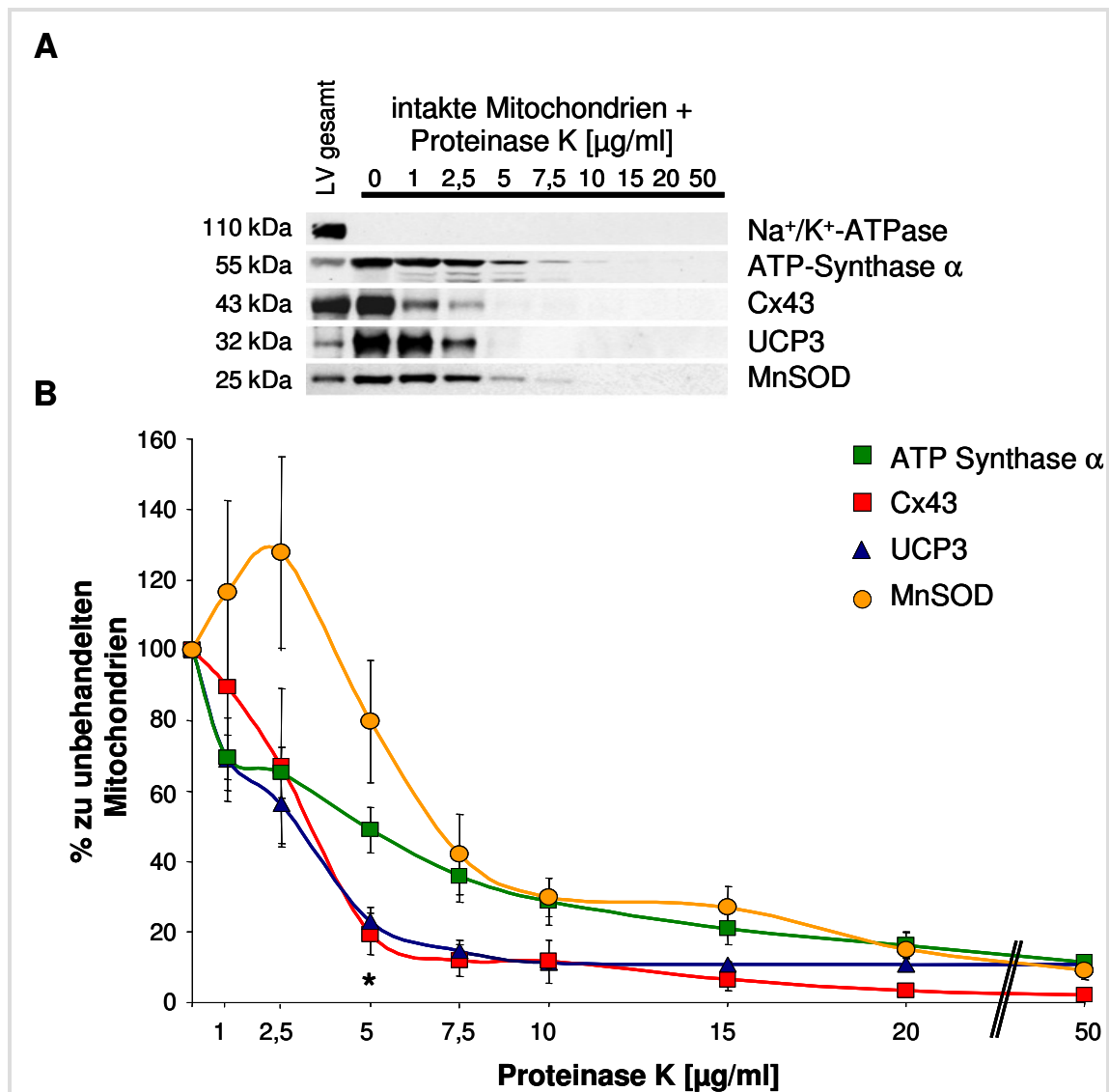
**Abb. 3.4: Schema des Mitochondrien-Verdau.**

Von außen nach innen wurden die SSM durch Proteinase K verdaut und der Grad des Verdauens anhand von Markerproteinen überprüft. Die Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) diente als Matrix-Marker. Der Antikörper, der die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte ATP-Synthase  $\alpha$  detektierte, erkannte ein Epitop auf der Matrix-Seite. Das Uncoupling-Protein 3 (UCP3) liegt ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran, der Antikörper band an ein im intermembranären Spalt liegendes Epitop. Der Antikörper gegen Cx43 band an den Carboxy-Terminus des Proteins.

### 3.2.1 Untersuchung isolierter SSM

Die mit Proteinase K verdauten SSM wurden im Western Blot auf die in Abbildung 3.4 beschriebenen Markerproteine hin untersucht. Der Western Blot in Abbildung 3.5 macht deutlich, dass UCP3 und Cx43 bei den gleichen Proteinase K-Konzentrationen detektierbar waren. Die statistische Auswertung in Abbildung 3.5 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Immunreaktionen der in der Matrix und im intermembranären Spalt bindenden Antikörperepitope bei einer Proteinase K-Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ . Der Carboxy-Terminus von Cx43 liegt somit im intermembranären Spalt.



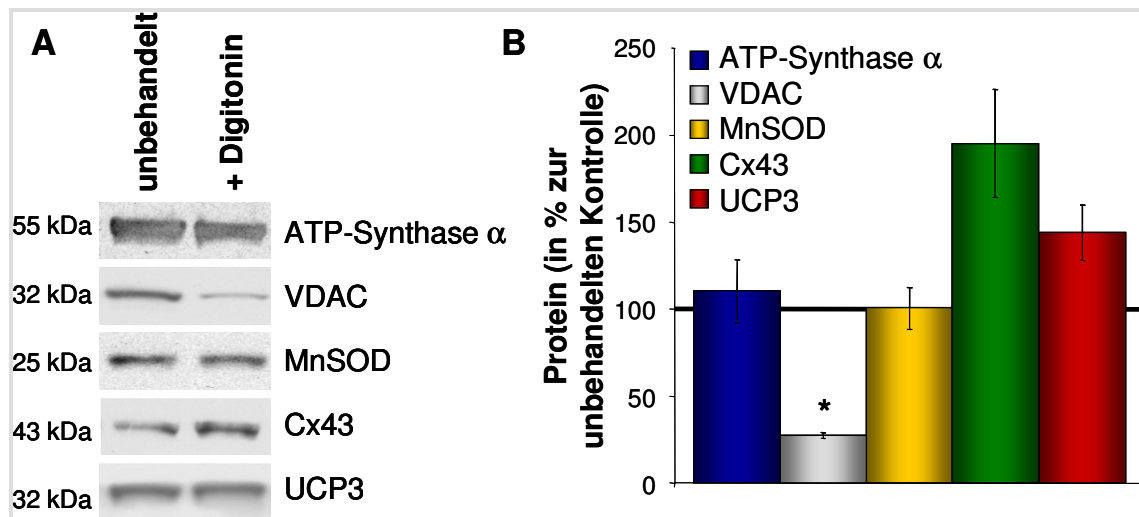


**Abb. 3.5: Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran isolierter SSM [Boengler et al., 2009].**

(A) zeigt ein typisches Western Blot-Experiment des Proteinase K-Verdaus. Die Immunreaktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase diente zum Nachweis der Reinheit der Mitochondrien-Präparation. Mit aufsteigender Proteinase K-Konzentration gingen alle Markerproteine verloren, die Mitochondrien waren vollständig verdaut. (B) zeigt die statistische Auswertung der Western Blot-Experimente. Die Immunreaktionen der unbehandelten Mitochondrien wurden gleich 100 % gesetzt und alle anderen Immunreaktionen wurden auf die Kontrolle bezogen. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM für n=6-7 unabhängige Experimente; \* signifikanter Unterschied p<0,05 zwischen den einzelnen Markerproteinen bei bestimmten Proteinase K-Konzentrationen.

### 3.2.2 Generierung und Untersuchung von Mitoplasten

Zur Gewinnung von Mitoplasten wurden isolierte SSM mit dem Detergenz Digitonin in einer Konzentration behandelt, welche die äußere Mitochondrienmembran ablöste, die innere Membran aber intakt ließ (Abb. 3.6).

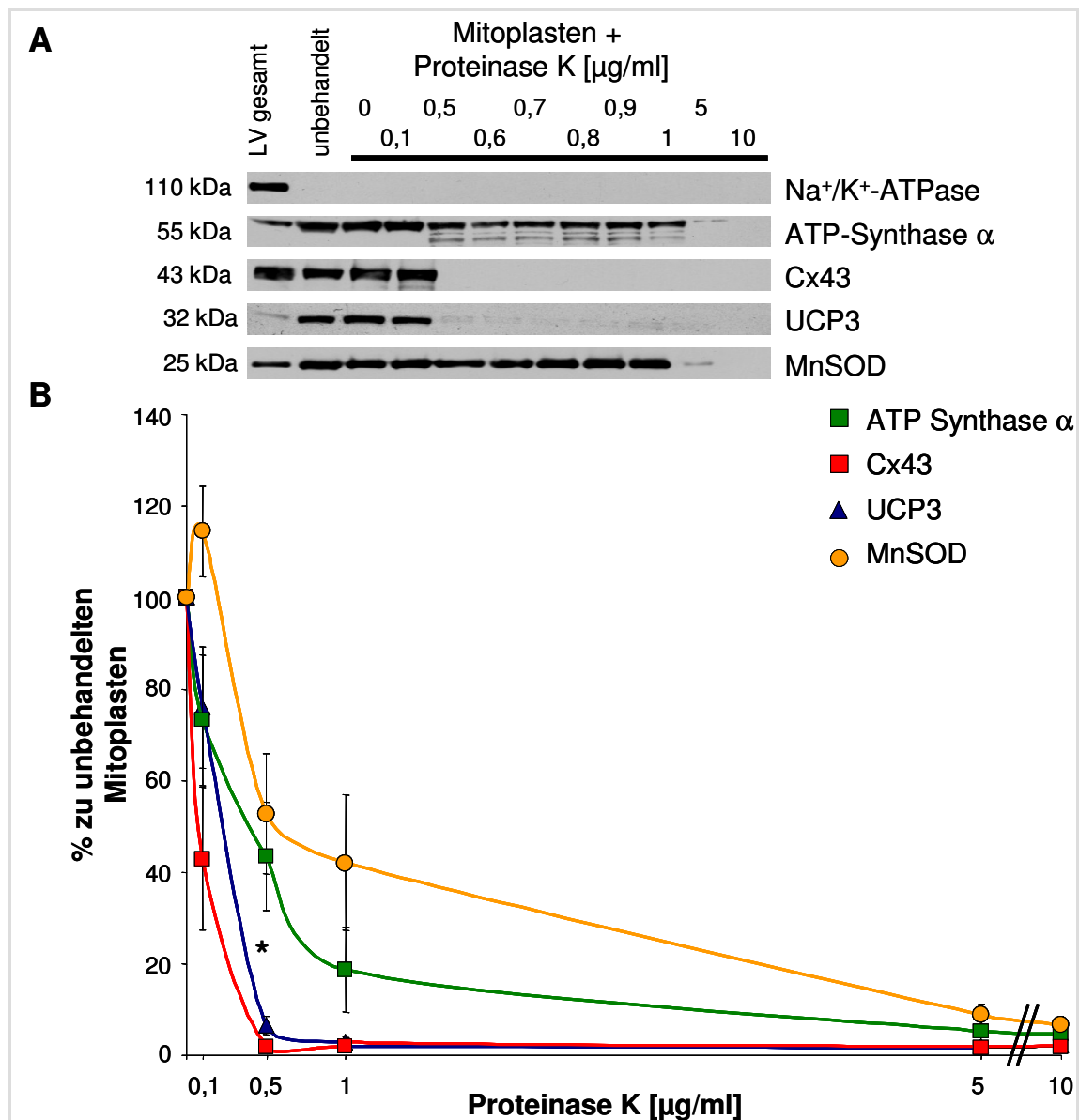


**Abb. 3.6: Western Blot-Untersuchung von Mitoplasten.**

(A) zeigt einen typischen Western Blot von Mitoplasten. Als Marker für die äußere Mitochondrienmembran diente VDAC (spannungsabhängiger Anionenkanal, voltage dependent anion channel). Die statistische Auswertung in (B) zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=3$  Experimenten; \* signifikanter Unterschied mit  $p<0,05$  zwischen unbehandelten und Digitonin-behandelten Mitochondrien.

Die so gewonnenen Mitoplasten wurden analog zu 3.2.1 mit Proteinase K verdaut und nachfolgend im Western Blot auf die in Abbildung 3.4 dargestellten Markerproteine untersucht. Auch die Untersuchung der Mitoplasten bestätigte die Lage des Carboxy-Terminus von Cx43 innerhalb des intermembranären Spalts (Abb. 3.7).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado konnte die Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran mit einer weiteren Methode bestätigt werden.

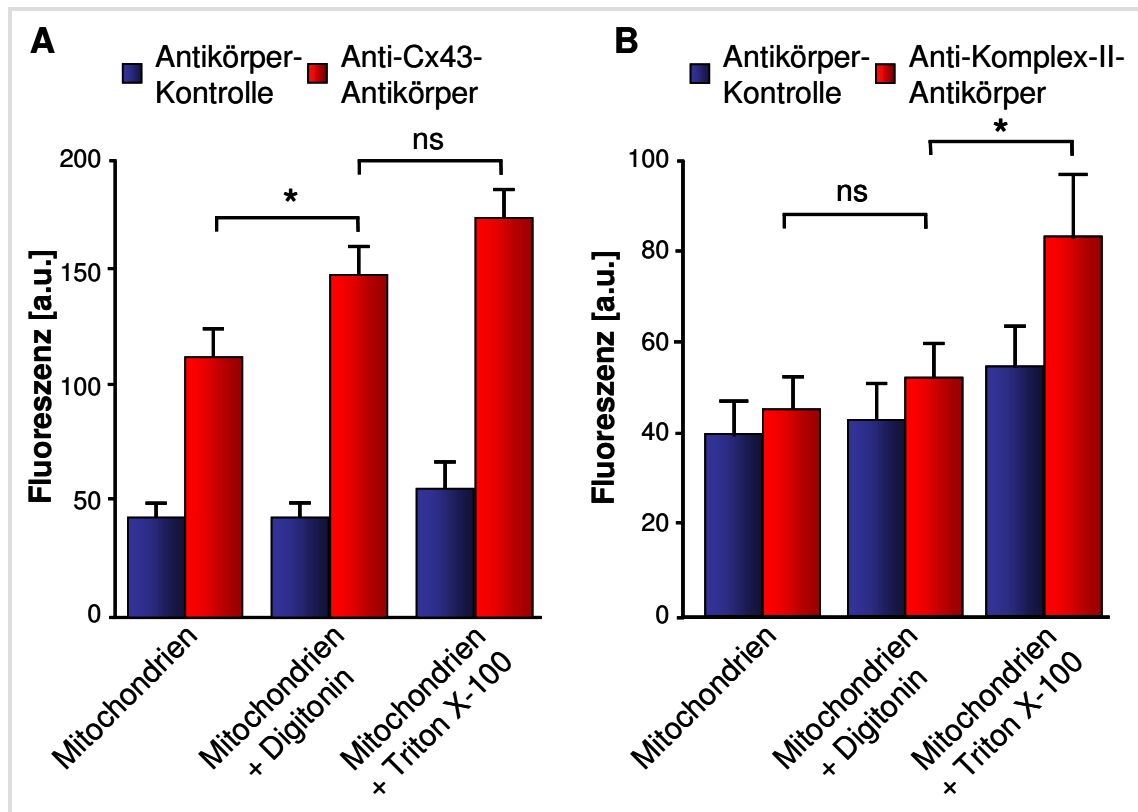


**Abb. 3.7: Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran isolierter Mitoplasten [Boengler et al., 2009].**

(A) zeigt ein typisches Western Blot-Experiment des Proteinase K-Verdaus von Mitoplasten. Die Immunreaktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase diente zum Nachweis der Reinheit der Mitochondrien-Präparation. Bei einer Proteinase K-Konzentration von 10 μg/ml waren die Markerproteine nicht mehr detektierbar, die Mitoplasten waren vollständig verdaut. (B) zeigt die statistische Auswertung der Western Blot-Experimente. Die Immunreaktionen der unbehandelten Mitoplasten wurden auf 100 % gesetzt und alle anderen Immunreaktionen wurden darauf bezogen. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM für n=5 unabhängige Experimente; \* signifikanter Unterschied mit p<0,05 zwischen den einzelnen Markerproteinen bei bestimmten Proteinase K-Konzentrationen.

### 3.2.3 Immunzytochemische Untersuchung fixierter SSM

In diesem Experiment wurden isolierte Ratten-SSM fixiert und mit Antikörpern gegen den Carboxy-Terminus von Cx43 sowie gegen die in die Matrix gerichtete Untereinheit des Respirationskomplexes II behandelt.



**Abb. 3.8: Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran [Miro-Casas et al., 2009].**

In (A) wird die Immunfluoreszenz des Antikörpers, der gegen den Carboxy-Terminus von Cx43 gerichtet ist, gezeigt. Durch Behandlung mit Digitonin ging die Membranintegrität der äußeren, durch Behandlung mit Triton X-100 die beider Mitochondrienmembranen verloren. Die Antikörperkontrolle zeigt die unspezifische Fluoreszenz nur bei Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper. (B) zeigt analog zu (A) die Immunfluoreszenz für die in der Matrix lokalisierte Untereinheit des Respirationskomplexes II (Komplex II). Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=5-6$  separaten Experimenten dargestellt; \* signifikanter Unterschied mit  $p<0,05$  zwischen den verschiedenen Behandlungen; ns bedeutet nicht-signifikant verschieden.

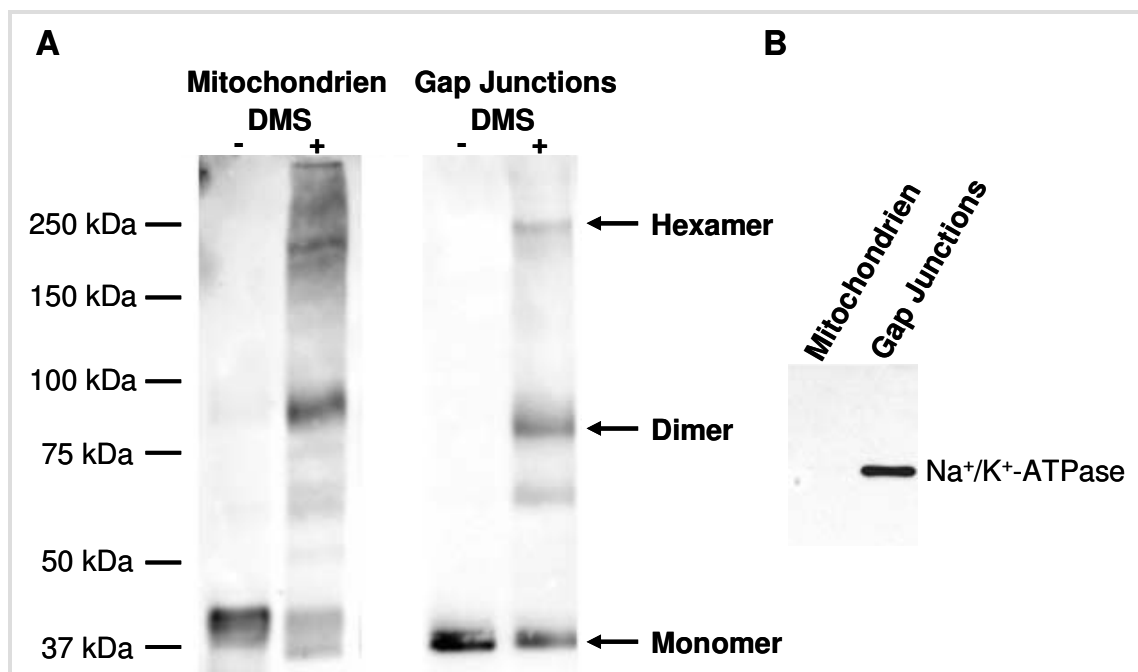
Durch zweischrittige Permeabilisierung einmal der äußeren und zum anderen beider Mitochondrienmembranen konnte zwischen den mitochondrialen Kompartimenten unterschieden werden. Die Behandlung mit dem Antikörper gegen den Respirationskomplex II diente als Kontrollkinetik für ein Epitop in der Matrix. Abbildung 3.8 zeigt die Immunfluoreszenzen in Abhängigkeit von den einzelnen Permeabilisierungsschritten. Die Fluoreszenzintensität des Carboxy-Terminus von

Cx43 stieg durch Veränderung der Membranintegrität einzig der äußeren Membran mit Digitonin signifikant an. Die Permeabilisierung beider Mitochondrienmembranen zeigte keine Intensitätserhöhung in der Fluoreszenz des Carboxy-Terminus von Cx43. Im Gegensatz dazu zeigte die Permeabilisierung beider Membranen eine Fluoreszenzerhöhung für den Respirationskomplex II. Die Veränderung der Membranintegrität einzig der äußeren Mitochondrienmembran bewirkte hingegen keine Veränderung der Fluoreszenzintensität. Der Carboxy-Terminus von Cx43 muss daher zum intermembranären Spalt hin orientiert sein.

Neben der Orientierung von Cx43 ist auch das Wissen über eine potentielle Bildung von Cx43-Halbkanälen in der inneren Mitochondrienmembran für die Einschätzung der Funktionen von Cx43 in Kardiomyozyten-SSM von großer Bedeutung.

### 3.3 Bildung von Cx43-Halbkanälen in SSM

#### 3.3.1 „Cross-Linking“-Experimente



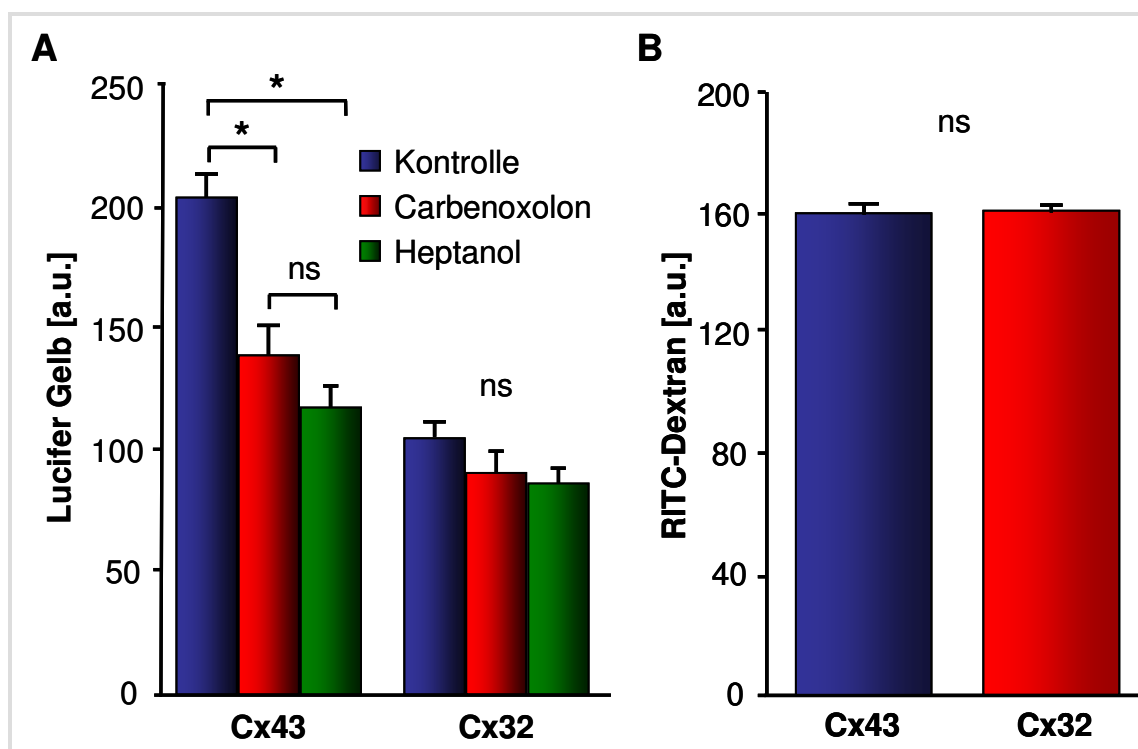
**Abb. 3.9: „Cross-Linking“-Experiment [Miro-Casas et al., 2009].**

(A) zeigt ein typisches Western Blot-Experiment isolierter SSM und Gap Junction angereicherter Plasmamembranproben mit und ohne den „Cross-Linker“ DMS. (B) zeigt die Reinheit der SSM durch das Fehlen der Antikörperreaktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

Abbildung 3.9 zeigt, dass in SSM ein Großteil des vorliegenden Cx43 bei Molekulargewichten detektiert wurde, die mit einer Dimer- oder einer Hexamer-Struktur vereinbar sind.

Ob die Hexamere einen funktionierenden Halbkanal in der inneren Mitochondrienmembran bilden, konnte aus diesem Experiment nicht erschlossen werden. Daher wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado die Bildung eines funktionellen Cx43-Halbkanals mit Hilfe eines Halbkanal-durchlässigen Farbstoffes untersucht.

### 3.3.2 Farbstoffaufnahme unter Verwendung von Cx43-Halbkanalblockern



**Abb. 3.10: Aufnahme des Halbkanal-durchlässigen Farbstoffs Lucifer Gelb und des Farbstoffes RITC-Dextran in isolierte SSM aus Cx43- sowie Cx32-Mauserherzen unter Verwendung verschiedener Kanalblocker [Miro-Casas et al., 2009].**

(A) zeigt die Fluoreszenz-Intensität von Lucifer Gelb nach Aufnahme in SSM isoliert aus Cx43-Wildtyp-Mäusen sowie aus Cx32-Mäusen unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart der chemisch verschiedenen Cx43-Kanalblocker Carbenoxolon und Heptanol. (B) zeigt die Fluoreszenz-Intensität von RITC-Dextran, einem Farbstoff, der nicht Halbkanal-spezifisch aufgenommen werden kann. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=4-5$  unabhängigen Experimenten; \* signifikanter Unterschied mit  $p<0,05$  zwischen den verschiedenen Behandlungen, ns bedeutet nicht-signifikant.

Zur Untersuchung, ob Cx43 funktionelle Halbkanäle in der inneren Mitochondrienmembran bildet, ist ein Farbstoff verwendet worden, der über Gap Junction- sowie über Halbkanäle aufgenommen wird. Abbildung 3.10 zeigt die Lucifer Gelb-Aufnahme in SSM isoliert aus Cx43-Wildtyp- und Cx32-Mauserherzen. Die SSM

aus Wildtyp-Mäusen nahmen etwa doppelt soviel Lucifer Gelb auf wie SSM aus Cx32-Mäusen. Die Farbstoffaufnahme war durch die Zugabe der beiden chemisch verschiedenen Gap Junction- sowie auch Halbkanalblocker Heptanol und Carbenoxolon nur in den Wildtyp-SSM deutlich reduziert, hatte aber auf die Farbstoffaufnahme der SSM isoliert aus den Cx32-Mäusen keinen Einfluss. Als Kontrolle wurde die Fluoreszenz des Kanal-undurchlässigen Farbstoffs RITC-Dextran in SSM aus Cx43-Wildtyp- und Cx32-Mäusen bestimmt, die in beiden Gruppen gleich war. Diese Daten deuten auf die Existenz eines Cx43-Halbkanales in SSM hin, der durch die Zugabe von Blockern, die sowohl Gap Junction- als auch Halbkanäle blockieren können, geschlossen werden kann.

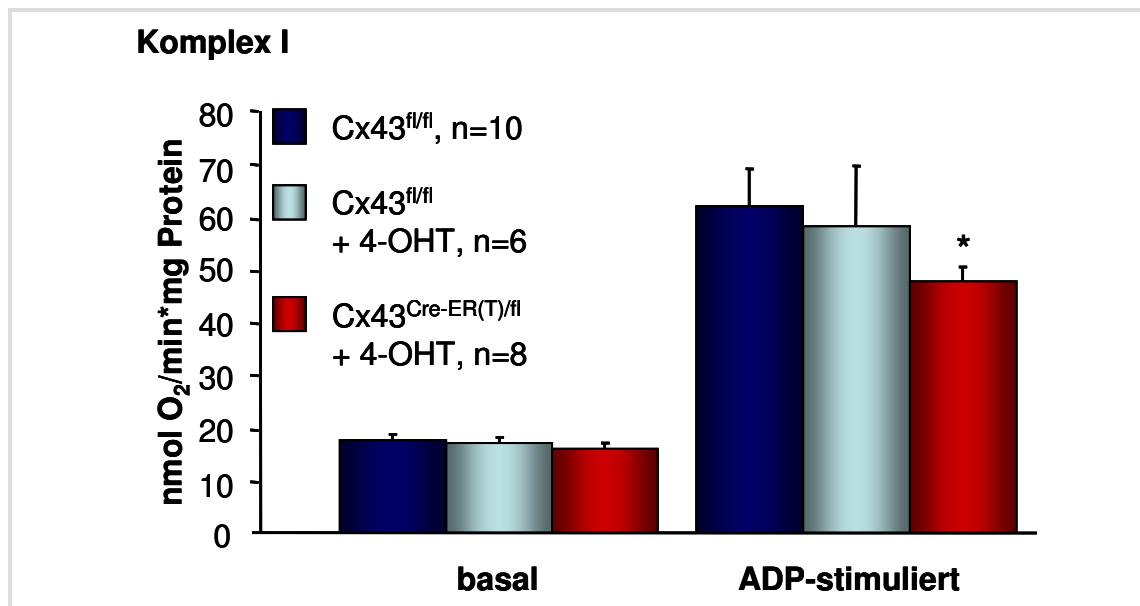
Nach Aufklärung der Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran sowie dem Nachweis der Halbkanalbildung stellte sich die Frage, ob Cx43 die Mitochondrienfunktion in SSM beeinflusst.

### **3.4 Funktion von Cx43-Halbkkanälen in der inneren Mitochondrienmembran**

Die Diazoxid-induzierte ROS-Produktion ist in Kardiomyozyten aus Cx43-defizienten Mäusen verringert [Heinzel et al., 2005]. Da in Mitochondrien ein Entstehungsort von ROS in der Atmungskette liegt, könnte mitochondriales Cx43 möglicherweise die mitochondriale Respiration beeinflussen. Unabhängig davon könnte mitochondriales Cx43 die Wirkung des Kalium-Kanalöffners Diazoxid durch Modulation des mitochondrialen KaliumEinstroms verändern. Daher wurde der Einfluss von Cx43 auf die mitochondriale Respiration sowie auf den mitochondrialen Kaliumhaushalt untersucht.

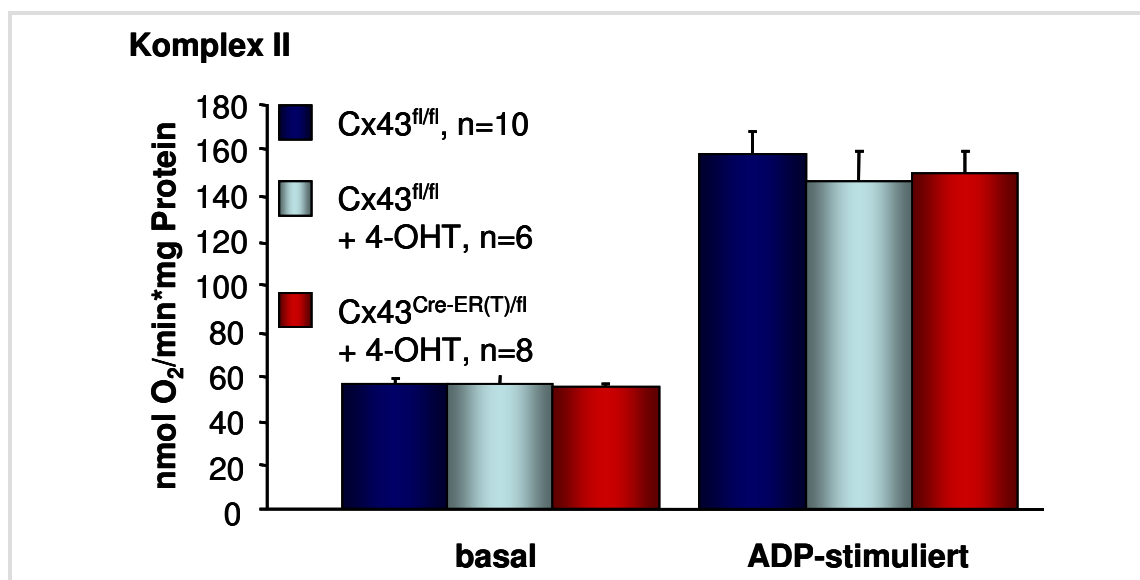
#### **3.4.1 Einfluss von Cx43 auf die mitochondriale Respiration**

Zur Untersuchung des Einflusses von Cx43 auf die mitochondriale Respiration wurden SSM aus Mausherzen von Cx43-Wildtyp sowie von konditionalen Cx43-Knockout-Mäusen isoliert. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl in Mitochondrien als auch im gesamten Herzgewebe der Cx43-Gehalt in konditionalen Cx43-Knockout-Mäusen durch Aktivierung der Cre-Rekombinase auf etwa 5-10 % reduziert ist [Boengler et al., 2005]. Außerdem wurde der Einfluss des Gap Junction-Blockers 18 $\alpha$ -Glycyrrhinsäure (18 $\alpha$ GA), der auch Halbkanäle inhibiert, auf die mitochondriale Respiration isolierter SSM aus Rattenherzen untersucht.



**Abb. 3.11: Sauerstoffverbrauch isolierter SSM unter Verwendung von Substraten für den Respirationskomplex I.**

Diese Abbildung zeigt den Sauerstoffverbrauch unter Verwendung der Substrate Glutamat und Malat für den Respirationskomplex I. Unter basalen und ADP-stimulierten Bedingungen wurde der Sauerstoffverbrauch isolierter SSM aus Mausherzen von 4-Hydroxytamoxifen-(4-OHT)-behandelten und unbehandelten Cx43<sup>fl/fl</sup>- sowie aus 4-OHT-behandelten Cx43<sup>Cre-ER(T)/fl</sup>-Mäusen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=6-10 unabhängigen Versuchen. \* zeigt einen signifikanten Unterschied  $p < 0,05$  zwischen den einzelnen Mausstämmen.



**Abb. 3.12: Sauerstoffverbrauch isolierter SSM unter Verwendung von Substraten für den Respirationskomplex II.**

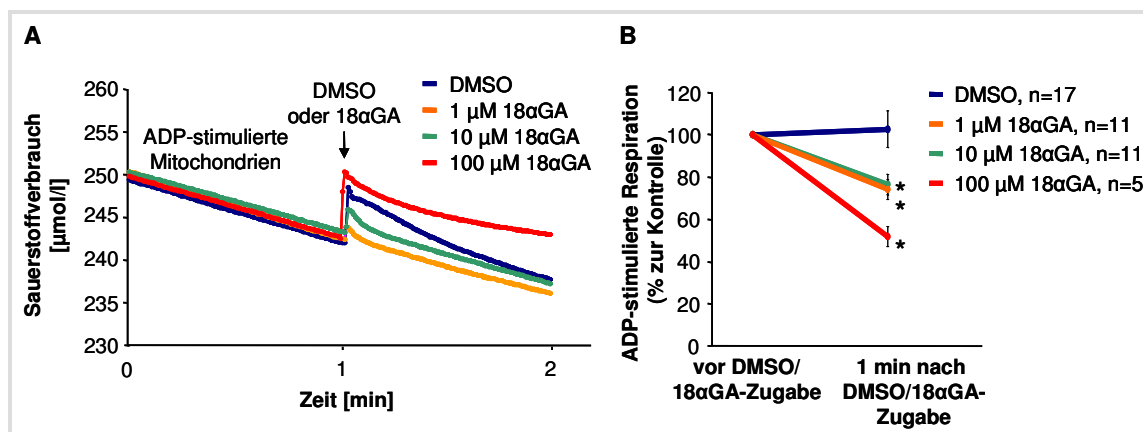
Diese Abbildung zeigt den basalen sowie den ADP-stimulierten Sauerstoffverbrauch unter Verwendung des Substrates Succinat und unter Respirationskomplex I-Blockade mit Rotenon von isolierten SSM aus 4-OHT-behandelten und unbehandelten Cx43<sup>fl/fl</sup>- sowie aus 4-OHT-



behandelten Cx43<sup>Cre-ER(T)/fl</sup>-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=6-10 unabhängigen Versuchen.

Die 4-Hydroxytamoxifen-Behandlung (4-OHT-Behandlung) beeinflusste die mitochondriale Respiration der Kontrolltiere nicht. Die basale Atmung unter Verwendung der Substrate für den Respirationskomplex I war unabhängig vom Cx43-Gehalt, die ADP-stimulierte Respiration war jedoch durch die Reduktion des Cx43-Gehaltes um etwa 20 % vermindert (Abb. 3.11). Die basale Atmung unter Respirationskomplex I-Blockade mit Substraten für den Respirationskomplex II war ebenfalls unabhängig vom Cx43-Gehalt; anders als bei Verwendung der Substrate für den Respirationskomplex I war auch die ADP-stimulierte Respiration mit Substraten für den Respirationskomplex II bei Cx43-Defizienz unverändert (Abb. 3.12).

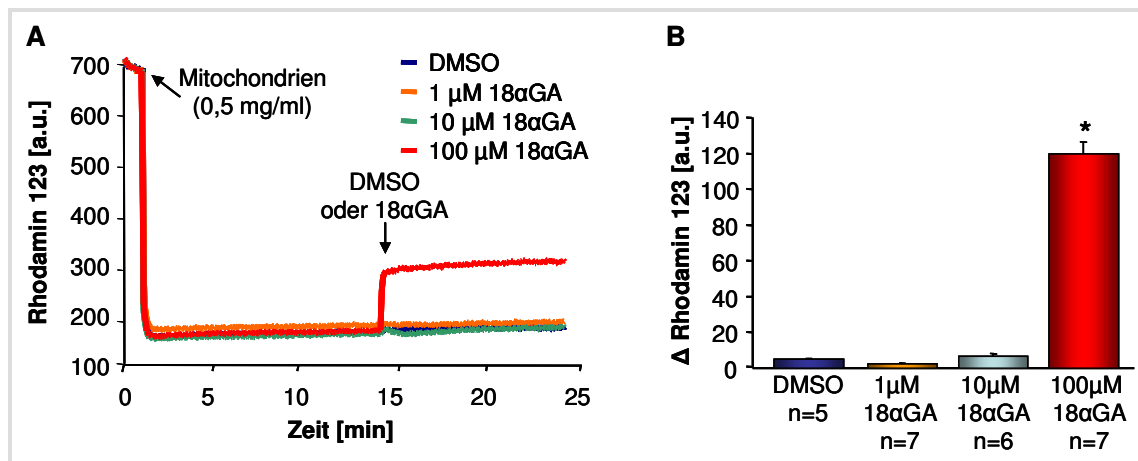
Der Einfluss von Cx43 auf die mitochondriale Respiration wurde außerdem durch Verwendung des Kanal-Blockers 18 $\alpha$ GA untersucht.



**Abb. 3.13: Einfluss von 18 $\alpha$ GA auf die mitochondriale Respiration.**

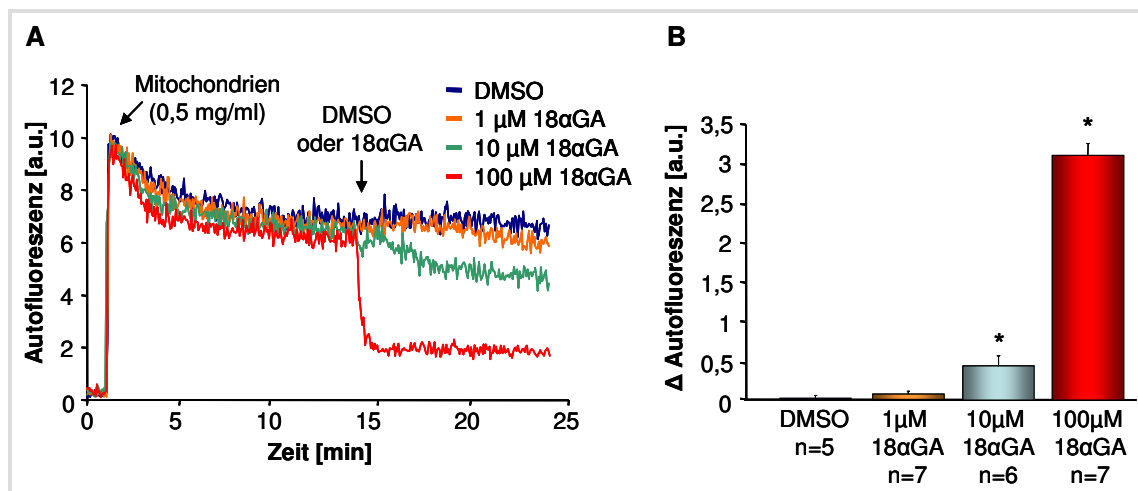
In (A) wird die Veränderung der ADP-stimulierten Atmung unter Zugabe der Substrate für den Respirationskomplex I exemplarisch gezeigt. Vor und nach Zugabe des 18 $\alpha$ GA-Lösungsmittels DMSO zur Kontrolle, sowie von verschiedenen Konzentrationen 18 $\alpha$ GA wurde der Sauerstoffverbrauch über eine Minute gemessen. (B) zeigt die statistische Auswertung von n=5-17 unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte prozentual zur Kontrolle  $\pm$  SEM von n=5-17 Experimenten; \* signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$  zwischen der Kontrolle und den einzelnen Behandlungen.

Alle verwendeten 18 $\alpha$ GA-Konzentrationen senkten die ADP-stimulierte Respirationskomplex I-Respiration signifikant (Abb. 3.13).



**Abb. 3.14: Untersuchung der Toxizität von 18 $\alpha$ GA durch Messung des Membranpotentials.**

In (A) ist ein typisches Experiment zur Bestimmung des Membranpotentials abgebildet. Rhodamin 123 wurde Membranpotential-abhängig von den SSM aufgenommen und bei Verlust des Membranpotentials wieder freigesetzt. (B) zeigt den Effekt als Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe der Substanzen als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=5-7 unabhängigen Experimenten; \* signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$  zwischen DMSO-Kontrolle und den einzelnen 18 $\alpha$ GA-Konzentrationen.



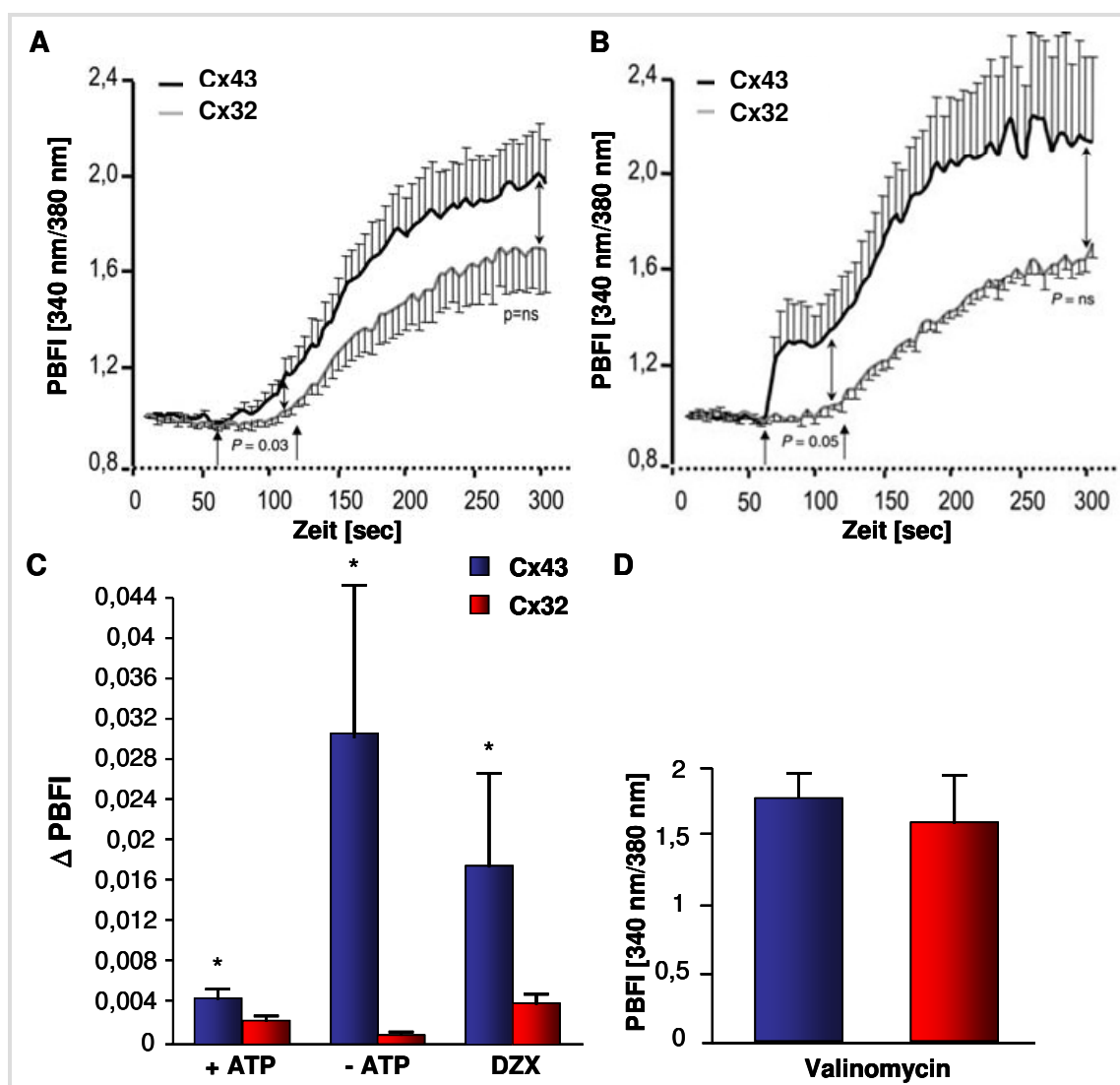
**Abb. 3.15: Untersuchung der Toxizität von 18 $\alpha$ GA durch Messung der Autofluoreszenz.**

In (A) sind typische Messkurven der SSM-Autofluoreszenz abgebildet. (B) zeigt den Effekt von 18 $\alpha$ GA sowie von DMSO als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=5-7 unabhängigen Autofluoreszenz-Messungen; \* signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$  zwischen DMSO-Kontrolle und den einzelnen 18 $\alpha$ GA-Konzentrationen.

Zur Überprüfung eines möglichen toxischen Effektes von 18 $\alpha$ GA auf isolierte Mitochondrien wurden die Effekte der unterschiedlichen 18 $\alpha$ GA-Konzentrationen auf das Membranpotential überprüft. Das Experiment in Abbildung 3.14 zeigt einen dosisabhängigen toxischen Effekt; bei der Zugabe von 100  $\mu$ M 18 $\alpha$ GA geht das

Membranpotential schlagartig verloren. Zur Überprüfung dieses Befundes wurde die Autofluoreszenz isolierter Mitochondrien gemessen. Abbildung 3.15 zeigt eine Reduktion/den Verlust der Autofluoreszenz bei  $18\alpha$ GA-Konzentrationen von  $10\text{ }\mu\text{M}$  und  $100\text{ }\mu\text{M}$ . In einer Konzentration ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ), in der weder das Membranpotential noch die Autofluoreszenz plötzlich verändert wurde und somit ein toxischer Effekt ausgeschlossen werden konnte, senkte  $18\alpha$ GA die ADP-stimulierte Respiration um etwa 20 % (Abb. 3.13). Die gleiche Reduktion konnte im konditionalen Knockout-Mausmodell erreicht werden (Abb. 3.11).

### 3.4.2 Rolle von Cx43 auf den mitochondrialen Kaliumgehalt



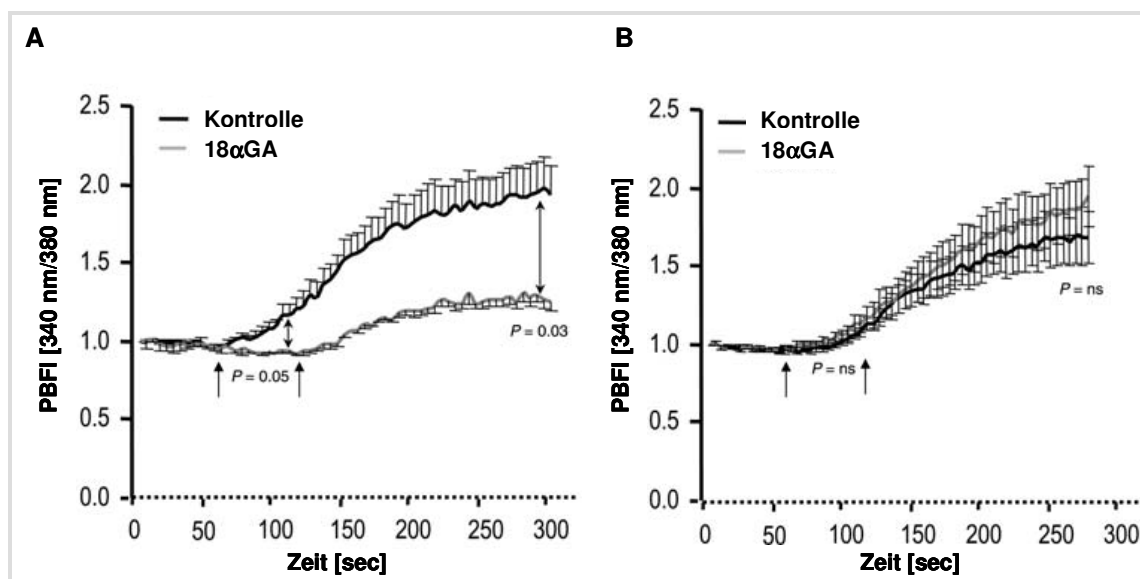
**Abb. 3.16:** Mitochondrialer Kaliumstrom in Cx43-Wildtyp- und Cx32-Mauskardiomyozyten [Miro-Casas et al., 2009].

(A) und (B) zeigen den mitochondrialen Kaliumstrom nach Zugabe von zwei 20 mM Kalium-Pulsen (Pfeile) in Kardiomyozyten aus Cx43-Wildtyp- und Cx32-Mäusen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm gemessen und der Quotient

gebildet. In (A) wurde der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanal durch Zugabe von 2 mM ATP blockiert, in (B) war dieser Kanal offen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=9-10$  Kardiomyozyten pro Gruppe; \* signifikanter Unterschied mit  $p<0,05$  zwischen Cx43 und Cx32; ns bedeutet nicht-signifikant verschieden. (C) zeigt den Fluoreszenzanstieg 15 Sekunden nach Zugabe des ersten Kalium-Pulses unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=7-10$  Zellen pro Gruppe. Der KaliumEinstrom wurde in Gegenwart und Abwesenheit von 2 mM ATP und in Gegenwart des  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffners Diazoxid (0,2 mM) gemessen. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Mausstämmen mit  $p<0,05$ . (D) zeigt den maximalen Kanal-unabhängigen KaliumEinstrom nach Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin (45 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=9-10$  Zellen pro Gruppe.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von David Garcia-Dorado wurde der Einfluss von Cx43 auf den mitochondrialen Kaliumgehalt untersucht.

Dazu wurden Kardiomyozyten aus Cx43-Wildtyp-Mäusen und aus Cx32-Mäusen isoliert. Nach Permeabilisierung der Kardiomyozyten mit Digitonin konnte der Kalium-bindende Fluoreszenz-Farbstoff PBFI in die Mitochondrien gelangen und so der mitochondriale KaliumEinstrom gemessen werden (vgl. 2.2.4 Kaliumgehalt).



**Abb. 3.17: Mitochondrialer Kaliumstrom in Cx43-Wildtyp- und Cx32-Mauskardiomyozyten mit und ohne den Halbkanalblocker 18αGA [Miro-Casas et al., 2009].**

(A) zeigt analog zu Abbildung 3.16 A den KaliumEinstrom in Kardiomyozyten-Mitochondrien aus Cx43-Wildtyp-Mausherzen nach Zugabe zweier Kaliumpulse (Pfeile) mit und ohne den Halbkanalblocker 18αGA (10 μM). (B) zeigt den Einfluss des Halbkanalblockers 18αGA auf den KaliumEinstrom in Kardiomyozyten-Mitochondrien aus Cx32-Mausherzen. Dargestellt sind ebenfalls die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=7-10$  Kardiomyozyten pro Gruppe; \* bedeutet signifikanter Unterschied mit  $p<0,05$  zwischen Kontrolle und 18αGA-Behandlung, ns bedeutet nicht-signifikanter Unterschied.

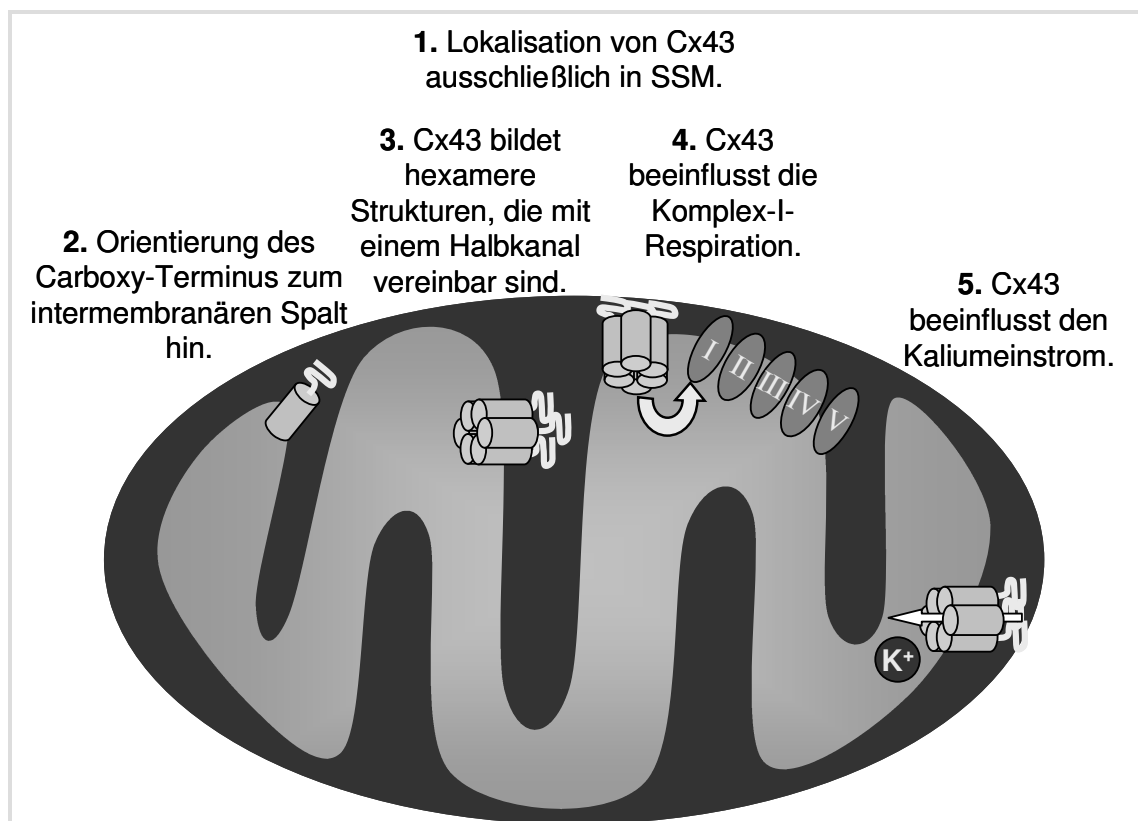
Abbildung 3.16 zeigt den Einfluss von Cx43 auf den mitochondrialen KaliumEinstrom unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Unter allen Versuchsbedingungen war der mitochondriale KaliumEinstrom bei den Cx43-Wildtyp-Mäusen signifikant größer als bei den Cx32-Mäusen. Im Versuchsverlauf glich sich der Kaliumgehalt in beiden Kardiomyozyten-Populationen an. Der initiale KaliumEinstrom war sowohl bei Zugabe von Diazoxid als auch bei offenem mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal (Abb. 3.16 C, -ATP) um ein Vielfaches größer als bei den Cx32-Mäusen. Für den KaliumEinstrom scheint Cx43 daher essentiell zu sein.

Zur weiteren Unterstützung dieses Befundes wurde der Effekt des Kanalblockers 18αGA auf den mitochondrialen KaliumEinstrom untersucht (Abb. 3.17). Die Bildung von Cx43-Halbkanälen schien den mitochondrialen KaliumEinstrom zu beeinflussen. Die Verwendung des Halbkanalblockers 18αGA verringerte den KaliumEinstrom signifikant und über den ganzen Messzeitraum hinweg (Abb. 3.17). Verglichen mit den Experimenten in Abbildung 3.16, bei denen es im Laufe des Experiments immer zu einer Angleichung der Kalium-Konzentration bis zum Ende der Messzeit kam und nur der initiale Anstieg zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen verschieden war, verhinderte in Abbildung 3.17 18αGA lang anhaltend die Kaliumaufnahme. 18αGA hatte auf den KaliumEinstrom in SSM isoliert aus Cx32-Mausherzen keinen Effekt; auf Grund der reduzierten Leitfähigkeit von Cx32-Halbkanälen war die Kaliumaufnahme von SSM isoliert aus diesem Mausstamm deutlich verzögert verglichen mit der von SSM isoliert aus Wildtyp-Mausherzen.

Cx43-Halbkanäle können die Respiration und den Kaliumhaushalt der Mitochondrien modulieren. Ein Verlust von Cx43 bzw. die Blockade der Cx43-Halbkanäle reduzierte die mitochondriale Respiration und verzögerte bzw. verhinderte die Aufnahme von Kaliumionen in die mitochondriale Matrix.

## 4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung, ob Cx43 auch in IFM lokalisiert ist. Des Weiteren wurde die Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran sowie die Bildung hexamerer Strukturen bestimmt und die funktionelle Rolle von Cx43 in den Mitochondrien aufgeklärt. Dies ist für das Verständnis der Rolle von mitochondrialem Cx43 von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cx43 1) ausschließlich in SSM vorkommt, 2) in der inneren Mitochondrienmembran mit dem Carboxy-Terminus zum intermembranären Spalt hin orientiert ist, 3) eine hexamere Struktur bildet, die mit der Bildung eines Halbkanaals einhergehen kann, und dass Cx43 4) die mitochondriale Respiration und 5) den Kaliumhaushalt moduliert (vgl. Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Ergebnisse der Arbeit.**

In dieser Arbeit konnte die Lokalisation von Cx43 ausschließlich in den SSM, die Orientierung des Carboxy-Terminus zum intermembranären Spalt hin und die Bildung von Cx43-Halbkälen in der inneren Mitochondrienmembran gezeigt werden. Außerdem modulierte Cx43 die ADP-stimulierte Respiration unter Verwendung der Substrate für den Respirationskomplex I und den Kaliumstrom in die mitochondriale Matrix.

#### 4.1 Cx43-Lokalisation, Orientierung und Halbkanalbildung

Neben den bekannten funktionellen Unterschieden zwischen SSM und IFM wurden einige Proteine beschrieben, deren Gehalt in beiden Populationen verschieden ist. So konnte im Quadrizepsmuskel (Streckmuskel des Oberschenkels) von Ratten ein höherer Gehalt an VDAC und Cyclophilin D in IFM gezeigt werden [Adhihetty et al., 2005]; dieser Befund wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Bindung von Cyclophilin D an die ADP/ATP-Translokase, neben VDAC ebenfalls als Komponente der mPTP diskutiert, öffnet die Pore. Substanzen, welche die Bindung von Cyclophilin D verhindern, hemmen oder verzögern die Öffnung der mPTP [Halestrap et al., 2004]. Der höhere Cyclophilin D-Gehalt in IFM sollte – so er mit einer vermehrten Bindung einhergeht – mit einer früheren mPTP-Öffnung in dieser Subpopulation assoziiert sein; allerdings war dies nicht der Fall, da das Kalzium-Rückhaltevermögen der IFM verglichen mit dem der SSM erhöht war [Hofer et al., 2009]. Jedoch wird die Porenöffnung neben der Kalzium- auch von der ROS-Konzentration und dem Membranpotential reguliert. In der Arbeit von Adhihetty *et al.* wurde in SSM eine stärkere ROS-Produktion und ein positiveres Membranpotential verglichen mit IFM nachgewiesen [Adhihetty et al., 2005]; beide Faktoren überwiegen möglicherweise den Effekt des erhöhten Cyclophilin D-Gehaltes in IFM und tragen zur verzögerten mPTP-Öffnung in IFM bei.

Cx43 ist das erste Protein, welches ausschließlich in SSM aus Kardiomyozyten lokalisiert ist. Damit kann Cx43 als erstes Markerprotein zur Unterscheidung der beiden Populationen verwendet werden. Unter Versuchsbedingungen, bei denen die anderen Antikörper-Immunreaktionen schon extrem verstärkt waren, konnte eine sehr schwache Cx43-Immunreaktion in der IFM-Präparation detektiert werden; dabei handelte es sich vermutlich um leichte Verunreinigungen der IFM-Fraktion mit SSM. Da mitochondriales Cx43 für die Vermittlung der Diazoxid-induzierten Präkonditionierung notwendig ist [Heinzel et al., 2005] und da Cx43 nur in SSM vorkommt, müssen diesen beiden Subpopulationen unterschiedliche Rollen bei der Diazoxid-induzierten Präkonditionierung zukommen. Auch für die ischämische Präkonditionierung ist Cx43 essentiell, denn in isolierten Kardiomyozyten aus Cx43-defizienten Mäusen [Li et al., 2003] und in Cx43-defizienten Mäusen *in vivo* [Schwanke et al., 2002] geht die Kardioprotektion verloren.

In Cx43-defizienten Tieren ist der Cx43-Gehalt an der Plasmamembran, aber vor allem auch innerhalb der Mitochondrien reduziert [Boengler et al., 2006]. Die Cx43-

abhängige Kardioprotektion an isolierten Kardiomyozyten ohne Zell-Zell-Kontakte via Gap Junctions legt den Schluss nahe, dass auch bei der ischämischen Präkonditionierung die mitochondriale Cx43-Lokalisation wichtig ist und daher SSM und IFM verschiedene Aufgaben in der Kardioprotektion übernehmen müssten. Tanaka-Esposito *et al.* fanden jedoch weder in SSM noch in IFM eine Veränderung der Mitochondrienfunktion im Hinblick auf die Respirationskomplex I-Aktivität oder den Sauerstoffverbrauch durch ischämische Präkonditionierung [Tanaka-Esposito *et al.*, 2007].

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Bildung von Cx43-Halbkanälen in der inneren Mitochondrienmembran nahe, die zumindest unter den gewählten experimentellen Bedingungen transient geöffnet waren, denn die Aufnahme von Halbkanal-permeablen Farbstoffen konnte durch Zugabe von Halbkanal-Blockern verhindert werden. Des Weiteren ist der Carboxy-Terminus und somit die Phosphorylierungsstellen von Cx43 im intermembranären Spalt lokalisiert. Durch welche Proteinkinasen und Proteinphosphatasen die Offenwahrscheinlichkeit und die Leitfähigkeit von Cx43-Halbkanälen in Mitochondrien reguliert werden, ist bislang unklar.

In dieser Arbeit konnte die Bildung von Cx43-Halbkanälen unter anderem durch „Cross-Linking“-Experimente nachgewiesen werden; neben Molekulargewichten, die Cx43-Monomeren und Hexameren entsprachen, war ein großer Anteil an Cx43 im Western Blot auch bei einem Molekulargewicht detektierbar, welches Cx43-Dimeren gleichkommen würde, sowohl in Mitochondrien, als auch in der als Kontrolle dienenden Gap Junction-angereicherten Plasmamembran-Fraktion. Entweder ist ein Teil der Cx43-Hexamere nach dem Verlinken in Dimere zerfallen, oder aber Cx43-Monomere sind mit anderen Proteinen (Kinasen/Phosphatasen) assoziiert, wodurch ein vergleichbares Molekulargewicht wie Cx43-Dimere erhalten wurde. Dies kann mit dieser Methode nicht unterschieden werden. Auch durch Halbkanal-durchlässige Farbstoffe unter Verwendung verschiedener Blocker, die sowohl Gap Junction- als auch Halbkanäle inhibieren können (Heptanol, Carbenoxolon), wurde die Existenz von Cx43-Halbkanälen in der inneren Mitochondrienmembran gezeigt, denn die Farbstoffaufnahme in isolierte SSM aus Wildtyp-Tieren wurde durch die Blocker-Zugabe reduziert. Neben den Blockern wurde als weitere Kontrolle auch ein Mausstamm verwendet, bei dem Cx43 durch Cx32 ersetzt wurde. Die verringerte Farbstoffaufnahme von isolierten SSM aus Cx32-Mäusen kann verschiedene



Ursachen haben. Zum einen haben Cx32-Halbkanäle eine geringere Leitfähigkeit, zum anderen aber ist bislang nicht untersucht worden, ob Cx32 in Mitochondrien ebenfalls hexamere Strukturen bildet.

An der Plasmamembran sind Cx43-Halbkanäle in der Regel transient geöffnet [Shintani-Ishida et al., 2007]. Die Hauptfunktion der Halbkanäle liegt in der Volumenregulation der Zelle, über sie können aber auch ATP, NAD<sup>+</sup> (Nikotinsäureamid-Dinucleotid) und andere Metabolite aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (vgl. 1.1.1). Cx43-Halbkanäle werden durch eine niedrige extrazelluläre [Quist et al., 2000] oder eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration geöffnet [Shintani-Ishida et al., 2007], ebenso wie durch Depolarisation des Membranpotentials zum Beispiel bei Ischämie [Rodriguez-Sinovas et al., 2007]. Cx43-Halbkanäle sind also unter Bedingungen geöffnet, bei denen die Gap Junction-Kommunikation gehemmt ist. Des Weiteren werden Cx43-Halbkanäle an der Plasmamembran ebenso wie Cx43-Gap Junction-Kanäle durch Phosphorylierung überwiegend geschlossen und durch Dephosphorylierung geöffnet [Rodriguez-Sinovas et al., 2007].

Mitochondriale Cx43-Kanäle müssen unter physiologischen Bedingungen in einer geschlossenen oder einer Konformation mit niedriger Leitfähigkeit vorliegen, damit das mitochondriale Membranpotential aufrecht erhalten werden kann.

Cx43 enthält je nach Spezies 10 bis 14 verschiedene PKC-Phosphorylierungsstellen [van Veen et al., 2001], die Phosphorylierung durch PKC $\epsilon$  schließt dabei Cx43-Halbkanäle und Gap Junction-Kanäle vollständig [Hawat und Baroudi, 2008]. PKC $\epsilon$  wurde ebenso wie PKC $\alpha$  im intermembranären Spalt von Rattenherz-Mitochondrien nachgewiesen [Costa et al., 2005; Wang et al., 2006]. Die mitochondriale Translokation von PKC $\delta$  konnte im humanen Atrium und in isolierten Mitochondrien aus Rattenherzen nachgewiesen werden, die submitochondriale Lokalisation ist jedoch noch unklar [Churchill et al., 2005; Kilts et al., 2005]. PKC $\beta$  wurde bislang nicht in Mitochondrien nachgewiesen. Neben PKC $\epsilon$  konnte auch die Translokation von ERK, JNK und p38 MAPK in die Mitochondrien gezeigt werden, wobei diese mit PKC $\epsilon$  ko-lokalisieren, einen Multifunktionskomplex vermutlich im intermembranären Spalt bilden und an der Phosphorylierung von BAD (Bcl-associated dimer) [Baines et al., 2002] und somit an anti-apoptotischen Signalwegen beteiligt sind [Baines et al., 2002]. Auch MAPK können mit dem Carboxy-Terminus von Cx43 interagieren und die Leitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten von mitochondrialen Cx43-

Halbkanälen regulieren [John et al., 2003]. Eine Interaktion mit PKA scheint eher unwahrscheinlich, da PKA in Herzmitochondrien in der Matrix und nicht an der inneren Mitochondrienmembran assoziiert gefunden wurde [Schwoch et al., 1990] und somit die Phosphorylierungsstellen im Carboxy-Terminus von Cx43 nicht erreichen kann. Die Ko-Lokalisation von mitochondrialem Cx43 mit PKA, MAPK, ERK oder JNK in Mitochondrien ist bislang jedoch nicht untersucht worden.

Sowohl bei der ischämischen als auch bei der Diazoxid-induzierten Präkonditionierung nimmt die Translokation von PKC-Isoformen in die Mitochondrien eine zentrale Rolle ein, denn PKC $\epsilon$ -Aktivierung führt dort zur Öffnung der mitoK<sub>ATP</sub>-Kanäle und ist somit essentiell für die Kardioprotektion [Jaburek et al., 2006; Jiang et al., 2006; Rottlaender et al., 2010]. Auch mitochondriales Cx43 ist ein Schlüsselprotein für die kardioprotektive Signaltransduktion, die durch ischämische sowie auch durch Diazoxid-induzierte Präkonditionierung aktiviert wird. Die direkte Interaktion von mitochondrialem Cx43 mit PKC $\epsilon$  vermittelt diese Kardioprotektion; dies konnten Rottländer *et al.* an Cx43-defizienten sowie an Wildtyp-Mauserherzen zeigen [Rottlaender et al., 2010].

Eine weitere direkte Interaktion mit mitochondrialem Cx43 ist für die GSK-3 $\beta$  beschrieben [Schulz et al., 2007], welche ebenfalls durch Präkonditionierung und Aktivierung des PI3K-Akt-Weges phosphoryliert und so inaktiviert wird. Nach Inaktivierung verhindert GSK-3 $\beta$  die Öffnung der mPTP während der Reperfusion [Ferdinandy et al., 2007]. Ob diese GSK-3 $\beta$ -Inaktivierung indirekt über Cx43 vermittelt wird, ob die Cx43-GSK-3 $\beta$ -Interaktion die mPTP-Öffnung verhindert oder ob dieser Prozess unabhängig von mitochondrialem Cx43 ist, wurde bislang nicht untersucht.

## 4.2 Funktion von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Cx43 die mitochondriale Funktion beeinflusst. Sowohl in isolierten Mitochondrien aus konditionalen Cx43-Knockout-Mauserherzen als auch durch Behandlung isolierter Mitochondrien mit einem Halbkanalblocker war die ADP-stimulierte Respiration bei Gabe der Substrate für den Respirationskomplex I reduziert, die Respiration ab dem Respirationskomplex II unter Respirationskomplex I-Blockade wurde jedoch nicht moduliert. Cx43 war außerdem an der Regulation des mitochondrialen KaliumEinstroms beteiligt, der bei Blockade des Cx43-Kanals oder auch bei Ersatz des Cx43 durch Cx32 reduziert war.

Der Kaliumgehalt der mitochondrialen Matrix steht in direktem Zusammenhang mit der mitochondrialen Respiration. Eine leichte Veränderung des Matrix-Kaliumgehaltes depolarisiert die innere Mitochondrienmembran, wodurch der Elektronentransport erleichtert und der Sauerstoffverbrauch sowie auch die ROS-Produktion gesteigert wird [Kicinska et al., 2000]. Bei starker Erhöhung des Kaliumgehaltes schwillt die mitochondriale Matrix an, wodurch die innere Mitochondrienmembran gedehnt und die Abstände zwischen den einzelnen Respirationskomplexen vergrößert werden. Dadurch wird die Respiration partiell entkoppelt und der Sauerstoffverbrauch und auch die ROS-Produktion weiter erhöht [Forbes et al., 2001]. Aus diesen Gründen ist der mitochondriale Kaliumgehalt eng reguliert, denn für die ATP-Produktion ist das mitochondriale Membranpotential und die Kopplung mit dem Sauerstoffverbrauch entscheidend [Garlid und Paucek, 2003]. Für den Kalium-Einstrom gibt es zwei verschiedene Kaliumkanäle, die Kalzium- oder ATP-abhängig reguliert sind, den  $K_{Ca}$ -Kanal und den  $\text{mitoK}_{ATP}$ -Kanal. Der Kaliumausstrom verläuft über den  $K^+/H^+$ -Antiporter, wodurch Protonen in die mitochondriale Matrix transportiert werden und dadurch der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran reduziert wird [Kaasik et al., 2007]. Jedoch wird im Zusammenhang mit dem mitochondrialen Kaliumgehalt auch immer ein Kalium-Leckstrom angegeben, bei dem es sich um einen kleinen, aber permanenten Kaliumeinstrom in die Matrix handelt [Carreira et al., 2005]. Dieser Leckstrom ist essentiell für die ATP-Produktion, denn beim Auspumpen der Protonen aus der Matrix bleibt durch den permanenten Kaliumeinstrom das Membranpotential stabil [Garlid und Paucek, 2003]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Cx43-abhängiger Kaliumeinstrom in die mitochondriale Matrix gemessen werden, wobei Cx43 vornehmlich die Kalium-Einstromgeschwindigkeit beeinflusste. Möglicherweise handelt es sich bei dem bisher beschriebenen Kalium-Leckstrom um diesen Cx43-abhängigen Kaliumeinstrom. Gegen diese Theorie spricht jedoch der schnellere Wiederaufbau des Membranpotentials nach ADP-Zugabe in den IFM, denn die mitochondriale Population mit dem erhöhten Respirationsvermögen müsste auch einen stärkeren Kalium-Leckstrom aufweisen; aber in den IFM konnte kein Cx43 nachgewiesen werden.

Die ROS-Produktion nach Diazoxidgabe ist in Mäusen mit reduziertem Cx43-Gehalt ebenfalls gesenkt [Heinzel et al., 2005]. Wie die ROS-Bildung mit Cx43 in Zusammenhang steht, ist bislang ebenso unklar wie der Mechanismus, über den

Cx43 den mitochondrialen Kaliumgehalt reguliert. Neben dem Cx43-Halbkanal ist auch eine Cx43-abhängige Modulation des mitoK<sub>ATP</sub>-Kanals denkbar. In Cx43-defizienten Mäusen könnte der reduzierte Cx43-Gehalt zu einer verringerten Interaktion von Cx43 mit mitoK<sub>ATP</sub>-Kanälen führen; dies könnte den Kaliumeinstrom senken. Auch nachfolgende Prozesse wie zum Beispiel die ROS-Produktion nach Diazoxid-induzierter mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffnung könnten dadurch reduziert sein. Veränderungen des mitochondrialen Kaliumgehaltes haben auch einen Einfluss auf den mitochondrialen Kalziumgehalt, denn ein verringerter Kaliumeinstrom depolarisiert die innere Mitochondrienmembran, wodurch vermehrt Kalzium in die Matrix einströmt und die Öffnung der mPTP begünstigt wird [Kaasik et al., 2007]. Kohlhaas *et al.* zeigten eine indirekte Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung durch die mitochondriale Kalzium-Konzentration sowie eine strenge Regulation der ROS-Produktion durch den Kalzium-Gehalt [Kohlhaas et al., 2010]. Des Weiteren war die mitochondriale Kalzium-Aufnahme im Herzinsuffizienz-Modell auf Grund der erhöhten intrazellulären Natrium-Konzentrationen verringert, weshalb die ROS-Produktion erhöht ist [Kohlhaas et al., 2010].

Die Öffnung der mPTP in der Reperfusionsphase nach einer lang anhaltenden Ischämie ist mit für den apoptotischen und nekrotischen Untergang der Kardiomyozyten verantwortlich. Bei der Kardioprotektion ist daher die Verzögerung der mPTP-Öffnung ein wesentliches Element [Ferdinandy et al., 2007]. Die Rolle von Cx43 beim Kaliumeinstrom könnte eine Erklärung dafür sein, dass die ischämische und die Diazoxid-induzierte Präkonditionierung mit Verlust des Cx43 ebenfalls verloren geht [Heinzel et al., 2005; Schwanke et al., 2002]. Rottländer *et al.* konnten schließlich zeigen, dass die Diazoxid-induzierte Öffnung der mitoK<sub>ATP</sub>-Kanäle in Cx43-defizienten Mausherzen, aber auch durch Verwendung mimetischer Peptide (Peptide, die aus einer Erkennungs-/Bindungssequenz des Zielproteins bestehen, dadurch Bindungspartner abfangen und so die Regulation des Zielprotein verhindern) oder chemischer Cx43-Kanalblocker vermindert ist. Auch die PKC $\epsilon$ -induzierte Öffnung der mitoK<sub>ATP</sub>-Kanäle ist in Cx43-defizienten Tieren verhindert. PKC $\epsilon$  ko-lokalisiert mit Cx43 in Mitochondrien und vermittelt die kardioprotektive mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal-Öffnung. In IFM, in denen kein Cx43 nachgewiesen werden konnte, sind die mitoK<sub>ATP</sub>-Kanäle PKC- und Diazoxid-insensitiv [Rottlaender et al., 2010].

In isolierten Mitochondrien verringerte eine Reduktion des Cx43-Gehaltes die Respirationskomplex I-Atmung, wohingegen die Respirationskomplex II-Atmung

unabhängig vom Cx43-Gehalt war. In Cx43-defizienten Mausherz-Mitochondrien war die Respirationskomplex I-Aktivität ebenfalls reduziert, die Respirationskomplex II-Aktivität hingegen blieb unverändert; dies konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. S. Rohrbach gezeigt werden. Die reduzierte Respirationskomplex I-Aktivität korreliert mit dem verringerten Sauerstoffverbrauch ab dem Respirationskomplex I in Cx43-defizienten Mausherz-Mitochondrien. Ob dieser Effekt von Cx43 auf die Respirationskomplex I-Aktivität und den Sauerstoffverbrauch direkt über eine Regulation des Respirationskomplexes I ausgelöst wird oder ob es sich um einen indirekten Einfluss durch den Cx43-modulierten Kaliumstrom handelt, ist bislang nicht untersucht worden.

### **4.3 Ausblick**

Die hier vorliegende Arbeit hat einige wichtige Fragen zur Funktion von Cx43 innerhalb der Mitochondrien aufgeklärt, aber auch weitere Fragen aufgeworfen. Daher sollen in weiterführenden Experimenten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Hat der Einsatz von PKC-Agonisten bzw. Antagonisten auch einen Einfluss auf die mitochondriale Respiration?
- Hat Cx43 einen Einfluss auf die Öffnung der mPTP und auf das mitochondriale Membranpotential und wie verändert eine Überexpression oder der altersbedingte Verlust von Cx43 die mitochondriale Funktion?

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Connexin 43 (Cx43) bildet Kanäle in der Plasmamembran und stellt so die Verbindung benachbarter Herzmuskelzellen her, wodurch diese elektrisch und chemisch miteinander gekoppelt sind. Cx43 ist neben der Plasmamembran auch in der inneren Mitochondrienmembran subsarkolemmaler Mitochondrien (SSM) lokalisiert. Die Öffnung mitochondrialer ATP-abhängiger Kalium-Kanäle und eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) stellen ebenso wie Cx43 zentrale Elemente in der Signaltransduktion der ischämischen sowie auch der Diazoxid-induzierten Präkonditionierung dar. In Cx43-defizienten Mäusen kann die durch Diazoxid ausgelöste Infarktgrößenreduktion und die gesteigerte ROS-Produktion nicht induziert werden; der Mechanismus ist weitgehend unklar. Eine direkte oder indirekte Modulation des KaliumEinstroms in die mitochondriale Matrix durch Cx43 ist ebenso möglich wie eine Veränderung der mitochondrialen Respiration. Ob Cx43 als Halbkanal oder als Einzelmolekül in der Mitochondrienmembran vorliegt und ob funktionelle Veränderungen durch Cx43 als regulatorisches Protein oder als Halbkanal vermittelt werden, ist bislang nicht untersucht worden. Außerdem ist bislang unklar, wohin der Carboxy-Terminus und somit die Phosphorylierungsstellen von Cx43 gerichtet sind. Unbekannt ist weiterhin, ob Cx43 in Herzmuskelzellen, in denen zwei mitochondriale Subpopulationen, SSM und interfibrilläre (IFM) existieren, auch in den IFM vorkommt. Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher (1) die Untersuchung der Lokalisation von Cx43 auch in IFM, (2) die Bestimmung der Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran, (3) die Aufklärung einer Cx43-Halbkanal-Bildung, die Untersuchung des Einflusses von Cx43 (4) auf die Respiration und (5) auf den mitochondrialen Kaliumgehalt.

Nach Isolation von SSM und IFM aus dem Rattenventrikel und nachfolgender Western Blot-Analyse wurde Cx43 ausschließlich in SSM nachgewiesen. Mittels kombinierter Proteolyse und anschließender Western Blot- sowie durch immunzytochemische Untersuchungen konnte der Carboxy-Terminus und somit die Phosphorylierungsstellen von Cx43 im intermembranären Spalt detektiert werden. „Cross-Linking“-Experimente sowie die Aufnahme eines Halbkanal-durchlässigen Farbstoffes in die mitochondriale Matrix legen die Existenz von Cx43-Halbkanälen nahe. In isolierten SSM aus Cx43-defizienten Mauserzen war die ADP-stimulierte Atmung bei Zugabe der Substrate für den Respirationskomplex I gegenüber Wildtyp-Mäusen reduziert, ebenso konnte der ADP-stimulierte Sauerstoffverbrauch durch

Behandlung isolierter SSM mit Halbkanalblockern gesenkt werden. Nach Isolation von Kardiomyozyten aus Wildtyp- sowie aus transgenen Mäusen, bei denen Cx43 durch Cx32 ersetzt wurde, konnte in Kardiomyozyten aus Wildtyp-Tieren ein schnellerer Kaliumeinstrom in die mitochondriale Matrix gemessen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen den ersten molekularen Unterschied zwischen den mitochondrialen Subpopulationen und lassen daher die Vermutung zu, dass es auch Unterschiede in der Beteiligung an kardioprotektiven Mechanismen geben könnte. Durch die Aufklärung der Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran kann ein besseres Verständnis der Regulation von Cx43-Halbkanälen erwartet werden. Erste Einblicke in die funktionelle Rolle von mitochondrialen Cx43-Halbkanälen sind im Zusammenhang mit der Diazoxid-induzierten sowie auch der ischämischen Präkonditionierung von großer Bedeutung und können bei weiteren Untersuchungen das Wissen um die Mechanismen der Kardioprotektion erweitern.

**LITERATURVERZEICHNIS**

Abete, P., Ferrara, N., Cacciatore, F., Madrid, A., Bianco, S., Calabrese, C., Napoli, C., Scognamiglio, P., Bollella, O., Cioppa, A., Longobardi, G., and Rengo, F., 1997. Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and elderly patients: a loss of preconditioning mechanism in the aging heart? *J Am Coll Cardiol* 30, 947-954.

Adhihetty, P.J., Ljubicic, V., Menzies, K.J., and Hood, D.A., 2005. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol* 289, C994-C1001.

Baines, C.P., Zhang, J., Wang, G.-W., Zheng, Y.-T., Xiu, J.X., Cardwell, E.M., Bolli, R., and Ping, P., 2002. Mitochondrial PKC $\epsilon$  and MAPK form signaling modules in the murine heart. *Circ Res* 90, 390-397.

Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C., and Saffitz, J.E., 1998. Rapid turnover of connexin 43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83, 629-635.

Beardslee, M.A., Lerner, D.L., Tadros, P.N., Laing, J.G., Beyer, E.C., Yamada, K.A., Kleber, A.G., Schuessler, R.B., and Saffitz, J.E., 2000. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin 43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 87, 656-662.

Boengler, K., Dodoni, G., Ruiz-Meana, M., Cabestrero, A., Rodriguez-Sinovas, A., Garcia-Dorado, D., Gres, P., Di Lisa, F., Heusch, G., and Schulz, R., 2005. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 67, 234-244.

Boengler, K., Schulz, R., and Heusch, G., 2006. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart* 92, 1724-1727.

Boengler, K., Stahlhofen, S., van de, S.A., Gres, P., Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Heusch, G., and Schulz, R., 2009. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res Cardiol* 104, 141-147.

Bowling, N., Huang, X., Sandusky, G.E., Fouts, R.L., Mintze, K., Esterman, M., Allen, P.D., Maddi, R., McCall, E., and Vlahos, C.J., 2001. Protein kinase C- $\alpha$  and - $\epsilon$  modulate connexin 43 phosphorylation in human heart. *J Mol Cell Cardiol* 33, 789-798.

Carreira, R.S., Facundo, H.T., and Kowaltowski, A.J., 2005. Mitochondrial K<sup>+</sup> transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. *Braz J Med Biol Res* 38, 345-352.

Chen, H.H., Baty, C.J., Maeda, T., Brooks, S., Baker, L.C., Ueyama, T., Gursoy, E., Saba, S., Salama, G., London, B., and Stewart, A.F., 2004. Transcription enhancer factor-1-related factor-transgenic mice develop cardiac conduction defects associated with altered connexin phosphorylation. *Circulation* 110, 2980-2987.



- Chen, Q. and Lesnefsky, E.J., 2006. Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free Radic Biol Med* 40, 976-982.
- Churchill, E.N., Murriel, C.L., Chen, C.H., Mochly-Rosen, D., and Szweda, L.I., 2005. Reperfusion-induced translocation of  $\delta$ PKC to cardiac mitochondria prevents pyruvate dehydrogenase reactivation. *Circ Res* 97, 78-85.
- Costa, A.D.T., Garlid, K.D., West, I.C., Lincoln, T.M., Downey, J.M., Cohen, M.V., and Critz, S.D., 2005. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 97, 329-336.
- Dang, X., Doble, B.W., and Kardami, E., 2003. The carboxy-tail of connexin 43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem* 242, 35-38.
- Desplantez, T., DuPont, E., Severs, N.J., and Weingart, R., 2007. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J Membr Biol* 218, 13-28.
- Doble, B.W., Ping, P., and Kardami, E., 2000. The  $\epsilon$  subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin 43 phosphorylation. *Circ Res* 86, 293-301.
- Duan, J. and Karmazyn, M., 1989. Effect of D,L-carnitine on the response of the isolated heart of the rat to ischaemia and reperfusion: relation to mitochondrial function. *Br J Pharmacol* 98, 1319-1327.
- Eckardt, D., Theis, M., Degen, J., Ott, T., van Rijen, H.V.M., Kirchhoff, S., Kim, J.-S., de Bakker, J.M.T., and Willecke, K., 2004. Functional role of connexin 43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J Mol Cell Cardiol* 36, 101-110.
- Ek-Vitorin, J.F., King, T.J., Heyman, N.S., Lampe, P.D., and Burt, J.M., 2006. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res* 98, 1498-1505.
- Ferdinandy, P., Schulz, R., and Baxter, G.F., 2007. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 59, 418-458.
- Forbes, R.A., Steenbergen, C., and Murphy, E., 2001. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88, 802-809.
- Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., and Ruiz-Maena, M., 2004. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 61, 386-401.
- Garlid, K.D. and Paucek, P., 2003. Mitochondrial potassium transport: the  $K^+$  cycle. *Biochim Biophys Acta* 1606, 23-41.
- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., and Javadov, S.A., 2004. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61, 372-385.

- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., and Khaliulin, I., 2007. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1767, 1007-1031.
- Hawat, G. and Baroudi, G., 2008. Differential modulation of unapposed connexin 43 hemichannel electrical conductance by protein kinase C isoforms. *Pflugers Arch* 456, 519-527.
- Heinzel, F.R., Luo, Y., Li, X., Boengler, K., Buechert, A., García-Dorado, D., Di Lisa, F., Schulz, R., and Heusch, G., 2005. Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice. *Circ Res* 97, 583-586.
- Heusch, G. and Schulz, R., 2006. Ischemic pre- and postconditioning. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 2169-2175.
- Hofer, T., Servais, S., Seo, A.Y., Marzetti, E., Hiona, A., Upadhyay, S.J., Wohlgemuth, S.E., and Leeuwenburgh, C., 2009. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong caloric restriction. *Mech Ageing Dev* 130, 297-307.
- Holmuhamedov, E.L., Jovanovic, S., Dzeja, P.P., Jovanovic, A., and Terzic, A., 1998. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol* 44, H1567-H1576.
- Jaburek, M., Costa, A.D., Burton, J.R., Costa, C.L., and Garlid, K.D., 2006. Mitochondrial PKC $\epsilon$  and mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes. *Circ Res* 99, 878-883.
- Jain, S.K., Schuessler, R.B., and Saffitz, J.E., 2003. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning. *Circ Res* 92, 1138-1144.
- Jiang, M.T., Ljubkovic, M., Nakae, Y., Shi, Y., Kwok, W.M., Stowe, D.F., and Bosnjak, Z.J., 2006. Characterization of human cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel and its regulation by phorbol ester in vitro. *Am J Physiol* 290, H1770-H1776.
- John, S., Cesario, D., and Weiss, J.N., 2003. Gap junctional hemichannels in the heart. *Acta Physiol Scand* 179, 23-31.
- Judge, S., Jang, Y.M., Smith, A., Hagen, T., and Leeuwenburgh, C., 2005. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *Faseb J* 19, 419-421.
- Kaasik, A., Safiulina, D., Zharkovsky, A., and Veksler, V., 2007. Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am J Physiol* 292, C157-C163.
- Kevin, L.G., Camara, A.K.S., Riess, M.L., Novalija, E., and Stowe, D.F., 2003. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O<sub>2</sub> radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 284, H566-H574.
- Kicinska, A., bska, D., Kunz, W., and Szewczyk, A., 2000. Mitochondrial potassium and chloride channels. *Acta Biochim Pol* 47, 541-551.

- Kilts, J.D., Grocott, H.P., and Kwatra, M.M., 2005.  $G\alpha_q$ -coupled receptors in human atrium function through protein kinase C  $\epsilon$  and  $\delta$ . *J Mol Cell Cardiol* 38, 267-276.
- Knapp, J., Gross, W., Gebhard, M.M., and Schaefer, M., 2005. Surface contact measurement of electrical cell uncoupling in the mouse heart during ischemia. *Bioelectrochemistry* 67, 67-73.
- Kohlhaas, M., Liu, T., Knopp, A., Zeller, T., Ong, M.F., Bohm, M., O'Rourke, B., and Maack, C., 2010. Elevated cytosolic  $Na^+$  increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 121, 1606-1613.
- Lampe, P.D., Cooper, C.D., King, T.J., and Burt, J.M., 2006. Analysis of connexin 43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *J Cell Sci* 119, 3435-3442.
- Lampe, P.D. and Lau, A.F., 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384, 205-215.
- Li, G., Whittaker, P., Yao, M., Kloner, R.A., and Przyklenk, K., 2002. The gap junction uncoupler heptanol abrogates infarct size reduction with preconditioning in mouse hearts. *Cardiovasc Pathol* 11, 158-165.
- Li, H., Brodsky, S., Kumari, S., Valiunas, V., Brink, P., Kaide, J.-I., Nasjletti, A., and Goligorsky, M.S., 2001. Paradoxical overexpression and translocation of connexin 43 in homocysteine-treated endothelial cells. *Am J Physiol* 282, H2124-H2133.
- Li, X., Schwanke, U., Heinzel, F.R., Schulz, R., and Heusch, G. No cardioprotection by ischaemic preconditioning in isolated cardiomyocytes from heterocygous connexin43-deficient mice. *Eur Heart J* 24, 716. 2003.
- Lurtz, M.M. and Louis, C.F., 2007. Intracellular calcium regulation of connexin 43. *Am J Physiol* 293, C1806-C1813.
- Miro-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Agullo, E., Stahlhofen, S., Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Jorge, I., Torre, I., Vazquez, J., Boengler, K., Schulz, R., Heusch, G., and Garcia-Dorado, D., 2009. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc Res* 83, 747-756.
- Miura, T., Miki, T., and Yano, T., 2010. Role of the gap junction in ischemic preconditioning in the heart. *Am J Physiol* 298, H1115-H1125.
- Miura, T., Ohnuma, Y., Kuno, A., Tanno, M., Ichikawa, Y., Nakamura, Y., Yano, T., Takayuki, M., Sakamoto, J., and Shimamoto, K., 2004. Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol* 286, H214-H221.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
- Nicholson, B.J., 2003. Gap junctions - from cell to molecule. *J Cell Sci* 116, 4479-4481.

- Opie, L.H. and Sack, M.N., 2002. Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 34, 1077-1089.
- Palmer, J.W., Tandler, B., and Hoppel, C.L., 1977. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac-muscle. *J Biol Chem* 252, 8731-8739.
- Palmer, J.W., Tandler, B., and Hoppel, C.L., 1986. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart-mitochondria to calcium. *Am J Physiol* 250, H741-H748.
- Piper, H.M., Kasseckert, S.A., Schluter, K.D., and Abdallah, Y., 2008. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury. *Dtsch Med Wochenschr* 133, 586-590.
- Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J.-S., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., and Willecke, K., 2000. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 10, 1083-1091.
- Quist, A.P., Rhee, S.K., Lin, H., and Lal, R., 2000. Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isoosmotic volume regulation. *J Cell Biol* 148, 1063-1074.
- Riva, A., Tandler, B., Loffredo, F., Vazquez, E., and Hoppel, C., 2005. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol* 289, H868-H872.
- Rodriguez-Sinovas, A., Boengler, K., Cabestrero, A., Gres, P., Morente, M., Ruiz-Meana, M., Konietzka, I., Miró, E., Totzeck, A., Heusch, G., Schulz, R., and Garcia-Dorado, D., 2006. Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res* 99, 93-101.
- Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Lopez, D., Torre, I., Morente, M., Abellan, A., Miro, E., Ruiz-Meana, M., and Garcia-Dorado, D., 2007. The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 219-232.
- Rottlaender, D., Boengler, K., Wolny, M., Michels, G., Endres-Becker, J., Motloch, L.J., Schwaiger, A., Buechert, A., Schulz, R., Heusch, G., and Hoppe, U., 2010. Connexin 43 is fundamental for cytoprotective signal transduction on mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels. *J Clin Invest*, doi:10.1172/JCI40927.
- Ruiz-Meana, M., Abellan, A., Miro-Casas, E., Agullo, E., and Garcia-Dorado, D., 2009. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol* 297, H1281-H1289.
- Saez, J.C., Retamal, M.A., Basilio, D., Bukausas, F.F., and Bennett, M.V.L., 2005. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochem Biophys Acta* 1711, 215-224.

- Schrader, J., 1985. Mechanisms of ischemic injury in the heart. *Basic Res Cardiol* 80, 135-139.
- Schulz, R., Boengler, K., Totzeck, A., Luo, Y., Garcia-Dorado, D., and Heusch, G., 2007. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev* 12, 261-266.
- Schulz, R., Gres, P., Skyschally, A., Duschin, A., Belosjorow, S., Konietzka, I., and Heusch, G., 2003. Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. *Faseb J* 17, 1355-1357.
- Schwanke, U., Konietzka, I., Duschin, A., Li, X., Schulz, R., and Heusch, G., 2002. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin 43-deficient mice. *Am J Physiol* 283, H1740-H1742.
- Schwoch, G., Trinczek, B., and Bode, C., 1990. Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases in mitochondria from various rat tissues. *Biochem J* 270, 181-188.
- Severs, N.J., Bruce, A.F., DuPont, E., and Rothery, S., 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 80, 9-19.
- Shintani-Ishida, K., Uemura, K., and Yoshida, K., 2007. Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *Am J Physiol* 293, H1714-H1720.
- Skyschally, A., Schulz, R., and Heusch, G., 2008. Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz* 33, 88-100.
- Suleiman, M.S., Halestrap, A.P., and Griffiths, E.J., 2001. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 89, 29-46.
- Tanaka-Esposito, C., Chen, Q., Moghaddas, S., and Lesnefsky, E.J., 2007. Ischemic preconditioning does not protect via blockade of electron transport. *J Appl Physiol* 103, 623-628.
- Totzeck, A., Boengler, K., van de, S.A., Konietzka, I., Gres, P., Garcia-Dorado, D., Heusch, G., and Schulz, R., 2008. No impact of protein phosphatases on connexin 43 phosphorylation in ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 295, H2106-H2112.
- van Veen, T.A.B., van Rijen, H.V.M., and Opthof, T., 2001. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* 51, 217-229.
- Wang, Y., Biswas, G., Prabu, S.K., and Avadhani, N.G., 2006. Modulation of mitochondrial metabolic function by phorbol 12-myristate 13-acetate through increased mitochondrial translocation of protein kinase C $\alpha$  in C2C12 myocytes. *Biochem Pharmacol* 72, 881-892.
- Zaugg, M., Lucchinetti, E., Uecker, M., Pasch, T., and Schaub, M.C., 2003. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth* 91, 551-565.

**TABELLENVERZEICHNIS**

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 2.1: Reaktionsansätze für die Genotypisierungs-PCR. ....  | 22 |
| Tabelle 2.2: Reaktionsschema für die Genotypisierungs-PCR. ....   | 22 |
| Tabelle 2.3: Übersicht aller verwendeten Primär- und Sekundärantikörper<br>und die verwendeten Verdünnungen. .... | 28 |

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1.1: Schematische Darstellung von Cx43 [modifiziert nach<br>Lampe und Lau, 2000].  | 2  |
| Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Mitochondriums und der<br>Atmungskette.  | 7  |
| Abb. 1.4: Die Zielsetzungen dieser Arbeit.  | 12 |
| Abb. 2.1: Mess-Schema einer Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ.   | 29 |
| Abb. 2.2: Ermittlung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches.   | 30 |
| Abb. 2.3: Ermittlung der Kalzium-Konzentration, welche die Öffnung der<br>mPTP induziert.   | 31 |
| Abb. 3.1: Sauerstoffverbrauch von SSM und IFM.  | 35 |
| Abb. 3.2: Bestimmung des Kalzium-Rückhaltevermögens.  | 36 |
| Abb. 3.3: Cx43-Gehalt in SSM und IFM [Boengler et al., 2009].   | 37 |
| Abb. 3.4: Schema des Mitochondrien-Verdaus.   | 38 |
| Abb. 3.5: Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran<br>isolierter SSM [Boengler et al., 2009].  | 39 |
| Abb. 3.6: Western Blot-Untersuchung von Mitoplasten.  | 40 |
| Abb. 3.7: Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran<br>isolierter Mitoplasten [Boengler et al., 2009].  | 41 |
| Abb. 3.8: Orientierung von Cx43 in der inneren Mitochondrienmembran<br>[Miro-Casas et al., 2009].   | 42 |
| Abb. 3.9: "Cross-Linking"-Experiment [Miro-Casas et al., 2009].   | 43 |
| Abb. 3.10: Aufnahme des Halbkanal-durchlässigen Farbstoffs Lucifer Gelb<br>und des Farbstoffes RITC-Dextran in isolierte SSM aus Cx43- sowie<br>Cx32-Mauserherzen unter Verwendung verschiedener Kanalblocker<br>[Miro-Casas et al., 2009]. | 44 |
| Abb. 3.11: Sauerstoffverbrauch isolierter SSM unter Verwendung von<br>Substraten für den Respirationskomplex I.   | 46 |

|   |    |
|---|----|
| Abb. 3.12: Sauerstoffverbrauch isolierter SSM unter Verwendung von Substraten für den Respirationskomplex II.   | 46 |
| Abb. 3.13: Einfluss von 18 $\alpha$ GA auf die mitochondriale Respiration.  | 47 |
| Abb. 3.14: Untersuchung der Toxizität von 18 $\alpha$ GA durch Messung des Membranpotentials.   | 48 |
| Abb. 3.15: Untersuchung der Toxizität von 18 $\alpha$ GA durch Messung der Autofluoreszenz.   | 48 |
| Abb. 3.16: Mitochondrialer Kaliumstrom in Cx43-Wildtyp- und Cx32-Mauskardiomyozyten [Miro-Casas et al., 2009].  | 49 |
| Abb. 3.17: Mitochondrialer Kaliumstrom in Cx43-Wildtyp- und Cx32-Mauskardiomyozyten mit und ohne den Halbkanalblocker 18 $\alpha$ GA [Miro-Casas et al., 2009]. | 50 |
| Abb. 4.1: Ergebnisse der Arbeit.  | 52 |

**ANHANG****Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Publikationen

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Miro-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Agullo, E., **Stahlhofen, S.**, Rodríguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Jorge, I., Torre, I., Vazquez, J., Boengler, K., Schulz, R., Heusch, G. and Garcia-Dorado, D., 2009. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc Res* 83, 747-756.

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, van de Sand, A., Gres, P., Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2009. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res Cardiol* 104,141-147.

Mann, S.A., Versmold, B., Marx, R., **Stahlhofen, S.**, Dietzel, I.D., Heumann, R. and Berger, R., 2008. Corticosteroids reverse cytokine induced block of survival and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from rats. *J Neuroinflammation* 5:39.

### publizierte Abstracts:

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, Konietzka, I., van de Sand, A., Gres, P., Buechert, A., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2010. STAT3 in the matrix of cardiomyocyte mitochondria regulates opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Clin Res Cardiol* 99, V1197 (abstr.).

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, Konietzka, I., van de Sand, A., Gres, P., Buechert, A., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2009. STAT3 in the matrix of cardiomyocyte mitochondria regulates opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Circulation* 120, S813-S814 (abstr.).

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, Ruiz-Meana, M., Miro-Casas, E., Garcia-Dorado, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2008. Orientation of connexin 43 in the Inner mitochondrial membrane and its role in respiration. *Circulation* 118, S\_354 (abstr.).

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, Rohrbach, S., Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2008. Connexin 43 regulates respiratory chain complex I activity and mitochondrial oxygen consumption. Eur Heart J 29, 797-798 (abstr).

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, Miro, E., Garcia-Dorado, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2008. Does connexin 43 form a hemichannel in the inner mitochondrial membrane? Clin Res Cardiol 97, P139 (abstr).

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, Kleibrink, B., Rohrbach, S., Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2007. Connexin 43 regulates mitochondrial oxygen consumption and respiratory chain complex I activity. Clin Res Cardiol 96,V7 (abstr).

### **Posterpräsentationen**

**Stahlhofen, S.**, Boengler, K., van de Sand, A., Gres, P., Buechert, A., Garcia-Dorado, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2009. Connexin 43 is present in subsarcolemmal but not in interfibrillar mitochondria of cardiac myocytes. Eur J Heart Fail, 955 (abstr).

Boengler, K., **Stahlhofen, S.**, van de Sand, A., Gres, P., Buechert, A., Garcia-Dorado, D., Heusch, G. and Schulz, R., 2009. Connexin 43 is present in subsarcolemmal but not in interfibrillar mitochondria of rat cardiac myocytes. FASEB J. 23, 508.3 (abstr).

**Stahlhofen, S.**, Bongler, K., Heusch, G., and Schulz, R., 2007. Bildet Connexin 43 einen Halbkanal in der inneren Mitochondrienmembran? Poster auf dem Forschungstag des Uniklinkums Essen

**Stahlhofen, S.**, Bongler, K., Kleibrink, B., Heusch, G., and Schulz, R., 2006. Einfluss von Connexin 43 auf die mitochondriale Respiration. Poster auf dem Forschungstag des Uniklinkums Essen

**ERKLÄRUNGEN****Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Lokalisierung, Orientierung und Funktion von Connexin 43 in Kardiomyozyten-Mitochondrien“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Sabine Stahlhofen befürworte.

Essen, den 19. April 2010

---

Prof. Dr. Elke Winterhager

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 19. April 2010

---

Sabine Stahlhofen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 19. April 2010

---

Sabine Stahlhofen